

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Keyt Uudeküll

**Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude varasel
diferentseerumisel**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogias

12 EAP

Juhendaja MSc Indrek Teino

TARTU 2016

"Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude varasel diferentseerumisel"

Inimese embrüonaalsed tüvirakud on pluripotentsed, mis tähendab, et neist on võimalik saada kõigi kolme lootelehe rakke. Lisaks on võimalik neid tänapäeval indutseerida diferentseeruma spetsiifiliste kemikaalide ja kommertsiaalsete söötmetega.

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on transkriptsioonifaktor, mis on enim tuntud kui keskkonnakemikaalide kahjutustaja, kuid üha enam näib sel olevat ka regulatoorne roll erinevates füsioloogilistes protsessides. Hiire puhul on näidatud, et embrüonaalsete tüvirakkude varajasel diferentseerumisel *Ahr*-i ekspressioon suureneb. Seetõttu püstitati antud bakalaureusetöös eesmärgiks uurida, kas *AHR*-i ekspressioon muutub ka inimese embrüonaalsete tüvirakkude H9 rakuliini varasel diferentseerumisel.

Saadud tulemustest leiti, et vastupidiselt hiire rakkudele langeb *AHR*-i ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude varasel diferentseerumisel.

Märksõnad: AHR, hES rakud, diferentseerumine, pluripotentsus, OCT4

"The expression of aryl hydrocarbon receptor in the early differentiation of human embryonic stem cells"

Human embryonic stem (hES) cells are pluripotent, which means that they are able to differentiate into all derivatives of the three primary germ layers. In addition, it is possible to induce their differentiation creating specific living environments with chemicals or special induction mediums.

Aryl hydrocarbon receptor is known as a transcription factor involved in the regulation of biological responses to environmental chemicals. Furthermore, it also serves as a regulator of different physiological processes. It has been shown in mice that in the early differentiation of embryonic stem cells the expression of aryl hydrocarbon receptor increases. Therefore, the purpose of the current thesis was to examine whether the expression of aryl hydrocarbon receptor also changes in the early induced differentiation of the H9 hES cell line.

The results of this thesis show a significant downregulation in the expression of aryl hydrocarbon receptor during the early differentiation of hES cells.

Keywords: AHR, hES cells, differentiation, pluripotency, OCT4

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Embrüonaalsed tüvirakud.....	7
1.1.1. Inimese embrüonaalsed tüvirakud.....	7
1.1.1.1. OCT4.....	8
1.1.1.2. SOX2.....	9
1.1.1.3. NANOG.....	9
1.2. Rakkude diferentseerumine.....	10
1.2.1. Embrüonaalne keha.....	10
1.2.2. Ektodermaalne diferentseerumine.....	11
1.2.3. Mesodermaalne diferentseerumine.....	12
1.2.4. Endodermaalne diferentseerumine.....	12
1.3. Arüülsüivesinike retseptor.....	13
1.3.1. Signaalirada.....	15
1.3.2. Arüülsüivesinike retseptori roll organismis.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjal ja metoodika.....	18
2.2.1. Kasutatud söötmed, kemikaalid ja rakuliin.....	18
2.2.2. Rakkude kasvatamine ja diferentseerimine.....	18
2.2.3. RNA eraldamine.....	20
2.2.4. mRNA spetsiifilise cDNA süntees.....	20
2.2.5. Kvantitatiivne PCR (qPCR).....	21
2.2.6. Pöördtranskriptsioon-PCR (RT-PCR).....	21
2.2.7. Gelelektroforees.....	22
2.2.8. SDS-PAGE ja Western blotting.....	23
2.2.9. Andmete statistiline analüüs.....	24
2.3. Tulemused.....	25
2.3.1. <i>AHR</i> -i mRNA ekspressioon embrüonaalsetes kehaosades.....	25
2.3.2. <i>AHR</i> -i suhteline valgu kogus embrüonaalsetes kehaosades.....	26
2.3.3. Indutseeritud diferentseerimise suunaspetsiifilisuse kontroll.....	27
2.3.4. <i>AHR</i> -i mRNA ekspressioon suunaspetsiifiliselt diferentseeritud rakkudes.....	27

2.3.5.	AHR-i valgu suhteline kogus suunaspetsiifiliselt diferentseeritud rakkudes ..	28
2.3.6.	<i>AHR</i> -i ekspressioon retinoolhappega töödeldud diferentseeruvates rakkudes	30
2.4.	Arutelu	32
	KOKKUVÕTE	35
	SUMMARY	36
	TÄNUSÕNAD	38
	KIRJANDUSE LOETELU	39
	KASUTATUD VEEBIALLIKAD	45
	LIHTLITSENTS	47

KASUTATUD LÜHENDID

AHR – arüülsüivesinike retseptor (*aryl hydrocarbon receptor*)

ARNT – arüülsüivesinike retseptori tuuma lokalisaator (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)

bHLH – heeliks-ling-heeliks (*basic helix-loop-helix*)

EB – embrüonaalne keha (*embryoid body*)

hES rakud – inimese embrüonaalsed tüvirakud (*human embryonic stem cells*)

NES – tuuma ekspordi signaal (*nuclear export signal*)

NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*)

OCT4 – oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 (*octamer-binding transcription factor 4*)

OTX2 – geeni nimetus inglise keeles (*orthodenticle homeobox 2*)

POLR2A – RNA polümeraas II subühik A [*polymerase (RNA) II subunit A*]

PVDF – polüvinülideen difluoriid (*polyvinylidene difluoride*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)

RT-PCR – pöördtranskriptsioon polümeraasi ahelreaktsioon (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

SDS PAGE – SDS-polüakrüülamiid-geelelektroforees (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)

SOX2 – geeni nimetus inglise keeles [*SRY (sex determining region Y)-box2*]

SOX17 – geeni nimetus inglise keeles [*SRY (sex determining region Y)-box17*]

SISSEJUHATUS

Inimese embrüonaalsed tüvirakud on rakud, mis on eraldatud blastotsüsti sisemisest rakumassist. Nad on pluripotentsed, mistõttu suudavad nad areneda kõigi kolme lootelehe rakkudeks (Thomson *et al.*, 1998). Embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse säilitamisel on olulised mitmed transkriptsioonifaktorid, milledest kõige tähtsamad on OCT4, SOX2 ja NANOG. (Lodish *et al.*, 2012) Seetõttu kasutatakse neid pluripotentsusmarkeritena rakkude iseloomustamiseks.

Inimese embrüonaalsed tüvirakud suudavad diferentseeruda mistahes rakuks embrüos. Kui neid kasvatada suspensioonkultuuris, arenevad embrüonaalsed tüvirakud embrüonaalseteks kehadeks, mis on kompleksed ja kolmemõõtmelised rakkude kogumikud (Dang *et al.*, 2002). Embrüonaalsed kehad sarnanevad varastele embrüotele, moodustades mitmesuguseid viimasele omaseid kudesid (Lodish *et al.*, 2012). Samuti on võimalik spetsiifiliste diferentseerumisprotsesside uurimiseks indutseerida embrüonaalseid tüvirakke diferentseeruma kindlasse arengusuunda, kasutades spetsiifilisi kemikaale või kommertsiaalseid söötmeid.

Arüülsüsivesinike retseptor on ligand-sõltuv heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor (NCBI d), mis on aktiveeritav mitmete ksenobiootiliste ja endogeensete ligandide poolt (Poland ja Knutson, 1982, Miller, 1997, Heath-Pagliuso, 1998). AHR on enim tuntud kui keskkonnakemikaalide kahjutustaja (NCBI d), kuid üha enam näib tal ka olevat füsioloogiline roll erinevates rakulistes protsessides, omades näiteks tähtsust rakkude jagunemise (Gasiewicz *et al.*, 2014) ning rakutsükli regulatsioonil (Hushka ja Greenlee, 1995) ja immuunsüsteemi väljakujunemisel (Abbott *et al.*, 1999).

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse inimese embrüonaalseid tüvirakke ning nende omadusi ja tähtsamaid pluripotentsusmarkereid. Samuti antakse ülevaade embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisest ja kirjeldatakse arüülsüsivesinike retseptori rolli inimese ja hiire rakkudes ning molekulaarset mehhanismi, mille kaudu ta mõjutab oma sihtmärkgeene. Praktilise osa eesmärgiks on uurida arüülsüsivesinike retseptori avaldumist inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes ja nende varasel diferentseerumisel.

Märksõnad: AHR, hES rakud, diferentseerumine, pluripotentsus, OCT4

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Embrüonaalsed tüvirakud

Pluripotentsus on raku võime areneda mistahes rakuks embrüos, kuid suutmatust diferentseeruda ekstraembrüonaalseteks kudedeks.

Peale esialgset lõigustumist moodustavad 16-raku staadiumis olevad rakud kompaktse moorula. Moorula areneb blastotsüstiks, mis koosneb sisemisest rakumassist ning trofoblastist. Seejuures annab sisemine rakumass aluse tulevasele embrüole, koondudes blastotsüsti ühele poolele. Varased blastomeerid suudavad areneda nii trofoblasti kui sisemise rakumassi rakkudeks ning on seetõttu totipotentsed. Sisemise rakumassi rakud ei suuda enam trofoblastiks areneda, mistõttu on saadud rakud pluripotentsed. (Gilbert, 2010)

Sisemisest rakumassist isoleeritud rakud on embrüonaalsed tüvirakud, mis võivad seejärel kultuuris piiramatult kasvada, uueneda ning areneda primaarsete lootelehtede rakkudeks (Lodish *et al.*, 2012).

1.1.1. Inimese embrüonaalsed tüvirakud

Esmakordselt eraldati inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud – *human Embryonic Stem Cells*) inimese blastotsüsti sisemisest rakumassist 1998. aastal. Isoleerimise tulemusena saadi 5 embrüonaalset tüvirakuliini, millest H9 rakuliin säilitas normaalse XX karüotüübi ka peale 6 kuud koekultuuris kasvamist. Erinevalt somaatilistest rakkudest on hES rakkudel kõrge telomeraasne aktiivsus ning nende telomeerid on pikad, mis on üheks eelduseks sellele, et nad suudavad lõpmatult jaguneda. Neid iseloomustab ka normaalne karüotüüp ning genoomne stabiilsus. (Thomson *et al.*, 1998)

Peale esmakordset hES rakkude eraldamist näidati, et inimese embrüonaalseid tüvirakke saab kasvatada ainult hiire embrüonaalsete fibroblastide toiterakkude kihi peal ilma, et toimuks rakkude diferentseerumine (Thomson *et al.*, 1998). Hiljem on näidatud, et hES rakke saab kasvatada ka erinevatel ekstratsellulaarse matriksi valke sisaldavatel pindadel (näiteks MatrigelTM-il või erinevatel laminiinidel). Seejuures säilib embrüonaalsete tüvirakkude normaalne karüotüüp, nende võime prolifereruda ja neile omane kõrge telomeraasne aktiivsus (Xu *et al.*, 2001). Praeguseks on välja töötatud palju erinevad söötmeid inimese embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamiseks *in vitro*.

Rakkude ainulaadse geeniekspressiooni tõttu saab neid üksteisest eristada molekulaarsete markerite põhjal. Ka hES rakkude pluripotentsuse säilitamises ja nende uuenumises osalevad mitmed molekulaarsed markerid, näiteks asuvad rakkude pinnal karbohüdraadid ja

glükoproteiinid, mida saab kasutada nende kirjeldamisel. Seejuures kattuvad mitmed hES rakkude pinnamarkerid ka inimese embrüonaalsete kartsinoomi rakkude markeritega, mistõttu neid hES rakkude isoleerimisel kasutada ei saa. (Prowse *et al.*, 2007) Selliste markerite hulka kuuluvad SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ja aluseline fosfataas. Seejuures ekspresseerub hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes ja kartsinoomi rakkudes marker SSEA-1, kuid erinevalt inimesest ei ekspresseeru antigeenid SSEA-3 ja SSEA-4, mis viitab hiire ja inimese olulisele erinevusele varases arenguetapis. (Thomson *et al.*, 1998)

Pluripotentsuse säilitamisel on oluline roll geenide regulatsioonis, milles osalevad mitmesugused transkriptsioonifaktorid. Näiteks oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 (OCT4 – *octamer-binding transcription factor 4*), SOX2 [*SRY (sex determining region Y)-box2*] ja NANOG omavad tähtsat funktsiooni organismi varasel arenguetapil (Lodish *et al.*, 2012). On näidatud, et nad reguleerivad nende geenide avaldumist, mis kodeerivad mitmeid arengus vajalikke homeodomäänidega transkriptsioonifaktoreid (Boyer *et al.*, 2005).

Erinevalt sisemisest rakumassist on trofoblasti rakkudes OCT4 ja NANOG ekspressioon inhibeeritud transkriptsioonifaktor CDX2 poolt, mistõttu need rakud ei ole pluripotentsed (Gilbert, 2010).

Erineva tundlikkuse tõttu diferentseerumise signaalide suhtes peetakse pluripotentsuse määramiseks hES rakkudes parimaks markeriks transkriptsioonifaktor OCT4, kuna selle ekspressioon langeb kiiresti rakkude diferentseerumisel (Ramirez *et al.*, 2011).

1.1.1.1. OCT4

OCT4 ehk oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 on POU perekonda kuuluv valk, mida kodeerib *POU5F1* ehk *OCT4* geen. Ülalmainitud transkriptsioonifaktor on oluline embrüonaalses arengus ja tüvirakkude pluripotentsuse säilitamisel. (NCBI a) Hiires on näidatud, et embrüo, milles puudub aktiivne *Oct4* geen, areneb küll blastotsüsti staadiumisse, kuid sisemise rakumassi rakud pole pluripotentsed (Nichols *et al.*, 1998).

OCT4 käitub ka rakutsükli regulaatorina. Selle inhibeerimine embrüonaalsetes tüvirakkudes põhjustab proliferatsiooni peatumist, peatades rakutsükli G0/G1faasis. (Lee *et al.*, 2010)

Seejuures seostatakse *POU5F1* geeni muutunud ekspressiooni ka vähi tekkega. (NCBI a)

Samuti on näidatud, et ka hES rakkudes toimub aktiivne *OCT4* geeni ekspressioon, mis tõendab selle transkriptsioonifaktori olulisust pluripotentsuse säilitamisel ka inimeses (Reubinoff, *et al.*, 2000).

Tüvirakkude uuenemisvõime säilitamisel näib seejuures oluline *Oct4* ekspressiooni kindla taseme säilitamine. Normaalsetes ja diferentseerumata hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes indutseerib *Oct4* ekspressiooni taseme 50-protsendiline tõus diferentseerumise endodermi või mesodermi ning 50-protsendiline alanemine diferentseerumise trofektodermi suunas. Seetõttu on pluripotentsete tüvirakkude fenotüübi säilitamiseks vajalik ka *Oct4* ekspressiooni hoidmine kindlal tasemel. (Niwa *et al.*, 2000)

1.1.1.2. SOX2

SOX2 on transkriptsioonifaktor, mis osaleb embrüonaalse arengu regulatsioonis. Seda kodeerib *SOX2* geen. *SOX2* geeni produktil on oluline roll kesknärvisüsteemi tüvirakkude säilitamisel. (NCBI b)

On näidatud, et hiires ekspresseerub *Sox2* algselt kõigis 4-rakuliste embrüote blastomeerides ning hiljem sisemises rakumassis ja epiblastis, avaldudes lõpuks vaid generatiivsetes rakkudes. Sellest tulenevalt ei arene embrüotes, milles puudub *Sox2* ekspressioon, pluripotentsed embrüonaalsed tüvirakud ning rakud diferentseeruvad eelkõige trofektodermi (Avilion *et al.*, 2003), mis tõendab *Sox2* olulisust pluripotentsuse säilitamisel.

Samuti on tuvastatud, et vähenenud *SOX2* ekspressioon põhjustab inimese embrüonaalsete tüvirakkude morfoloogia muutust, viimastele omaste antigeenide ekspressiooni kadumist ning rakkude diferentseerumist trofektodermi. *SOX2* avaldumise langus põhjustab omakorda *OCT4* ja *NANOG* ekspressiooni vähenemist, mis viitab nende koostööle pluripotentsuse säilitamisel. (Fong *et al.*, 2008)

1.1.1.3. NANOG

NANOG on homeodomeeni omav DNA-ga seonduv transkriptsioonifaktor, mis on kodeeritud samanimelise geeni poolt. See valk reguleerib embrüonaalsete tüvirakkude proliferatsiooni, nende uuenemisvõimet ja pluripotentsust. NANOG pidurdab embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumist ning represseerib enda geeni ekspressiooni diferentseeruvates rakkudes. (NCBI c)

Nanog geeni ekspressiooni inhibeerimine põhjustab hiires nii sisemise rakumassi kui embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse kadumist (Mitsui *et al.*, 2003). On näidatud, et *Nanog* ekspressioon on esmakordselt täheldatav moorula staadiumis enne blastotsüsti moodustumist. Blastotsüsti staadiumis avaldub *Nanog* vaid sisemises rakumassis ning

implantatsioonil seda geeni enam ei ekspresseerita. (Rodda *et al.*, 2005) See viitab Nanog olulisusele pluripotentsuse säilitamisel.

1.2. Rakkude diferentseerumine

Pluripotentsed hES rakud suudavad diferentseeruda mistahes organismiomasteks rakkudeks. Sisemine rakumass jaguneb edasise arengu käigus hüpoblastiks ja epiblastiks, millesse moodustub amnioniõõs. Seejuures jaguneb epiblast amnioni ektodermiks ja embrüo epiblastiks. Epiblastist jääb vastu hüpoblasti alles embrüo epiblast, millest arenevadki kõik embrüo lootelehed – ektoderm, endoderm ja mesoderm (Gilbert, 2010)

In vitro hES rakud diferentseeruvad, kui neid kasvatada ilma hiire embrüonaalsete fibroblastide toiterakkude kihi ja spetsiifilise maatriksita (Thomson *et al.*, 1998). Kui tüvirakke kasvatada suspensioonkultuuris, moodustuvad embrüonaalsed kehad, mis sarnanevad varastele embrüotele, moodustades mitmesuguseid viimasele omaseid kudesid (Lodish *et al.*, 2012).

Lisaks varasemalt näidatud diferentseerumisele suspensioonkultuuris on tänapäeval võimalik kasutada ka erinevaid kemikaale või kommertsiaalseid söötmeid, mis suunavad hES rakud diferentseeruma. (Keller *et al.*, 2005)

Tänu rakkude diferentseerimise meetodite arengule on tänapäeval seda lihtne rakendada täpsete diferentseerumisprotsesside väljaselgitamiseks. See võimaldab embrüonaalseid tüvirakke diferentseerida spetsiifilisteks rakutüüpideks, mida saab kasutada uute ravimite väljatöötamisel ning edaspidi ka transplantatsioonil. (Keller *et al.*, 2005)

1.2.1. Embrüonaalne keha

hES rakke saab indutseerida diferentseeruma läbi embrüonaalse keha vahelmise etapi. Embrüonaalne keha on kompleksne ja kolmemõõtmeline rakkude kogumik. (Dang *et al.*, 2002) Kasvatades embrüonaalseid kehi *in vitro*, diferentseeruvad rakud ektodermaalsesse, mesodermaalsesse ja endodermaalsesse suunda. Algselt on embrüonaalsed kehad moodustunud tihedalt kasvanud hES rakkudest, moodustades lihtsad embrüonaalsed kehad. Hiljem tekib embrüonaalsete kehade keskele õõnsus ja need täituvad vedelikuga, moodustades tsüstilisi embrüonaalseid kehi. (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000)

Esimeste diferentseerumispäevade jooksul moodustuvad embrüonaalsed kehad rakkudest, milles ekspresseeruvad primitiivsele endodermile ja mesodermile vastavad geneetilised markerid, mis edasi arenevad juba erinevat tüüpi organismiomasteks rakkudeks (Martin, 1981, Keller *et al.*, 1993).

Diferentseerimise indutseerimine läbi embrüonaalse keha on lihtne meetod, mistõttu saab seda kasutada diferentseerumisprotsesside uurimiseks. Lisaks tõstab kolme-dimensionaalse struktuuri moodustumine rakk-rakk kontakti teket, mis on tähtis teatud arenguprogrammides, luues parema mudeli arenguprotsesside uurimiseks.

Seejuures on saadud rakkude populatsioon aga väga heterogeenne, mis teeb meetodi ebaspetsiifiliseks. Tsütokiinide teke ja faktorite indutseerimine embrüonaalsetes kehaosades teeb kindla arengusuuna signaaliradade interpreteerimise raskeks. (Keller *et al.*, 2005) Seetõttu kasutatakse spetsiifiliste arengusuundade uurimiseks diferentseerimise indutseerimist spetsiifiliste kemikaalide ja söötmetega.

1.2.2. Ektodermaalne diferentseerumine

Ektoderm moodustab selgroogse organismi arengu käigus närvisüsteemi ning epidermise. Eelmainitud looteleht diferentseerub neuraalharjaks, neuraaltoruks ja epidermiseks. Seejuures annab neuraalhari aluse perifeersetele neuronitele, näo kõhreliste struktuuridele ja pigmendi tekkele, neuraaltoru areneb vastavalt ajuks ning seljakeelikuks. (Gilbert, 2010)

Neuraalsel diferentseerumisel osalevad mitmed signaalmolekulid. On näidatud, et neuraaltoru sulgumise eest vastutavad mitmed geneetilised faktorid nagu näiteks *Sonic hedgehog* ja *Pax3*, kuid tähtis roll on ka kolesteroolil ja folaadil. Seejuures dorsaal-ventraalse telje kujunemisel osalevad TGF- β perekonna valgud ja *Sonic hedgehog*. (Gilbert, 2010) Arengu käigus on eesaju regiooni väljakujunemisel oluline ka *Otx2* (*orthodenticle homeobox 2*) ekspressioon neuroektodermis (Tian *et al.*, 2002), mistõttu saab seda kasutada ka neuraalse suuna markerina.

In vitro on hiire embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerimist neuraalses suunas indutseeritud retinoolhappega, mille tulemusena saadud rakud on neuronitele sarnase fenotüübiga. Samuti ekspresseerivad need rakud neuronitele omaseid geneetilisi markereid. (Bain *et al.*, 1995) Lisaks on näidatud, et rakkude kasvatamisel defineeritud koekultuuritingimustes võib saada oligodendrotsüüte, astrotsüüte ja neuroneid, mis on kesknärvisüsteemi komponendid (Okabe *et al.*, 1996). Nii diferentseerides on võimalik saada ka erinevaid neuronite subtüüpe. Seejuures on kasvukultuuri lisatud selles suunas diferentseerumist indutseerivaid faktoreid ja valke nagu näiteks *Sonic hedgehog* ja FGF8. (Kim *et al.*, 2002)

1.2.3. Mesodermaalne diferentseerumine

Mesodermaalsel diferentseerumisel jaguneb neurula staadiumis mesoderm viite regiooni: kordomesoderm, paraksiaalne ehk somiitide mesoderm, vaheline mesoderm, lateraalplaadi mesoderm ja pea mesoderm (Gilbert, 2010).

Arengu käigus moodustab kordomesoderm notokordi, mis indutseerib neuraalitoru arengu ja määrab organismi anterioorse-posterioorse telje. Notokordi mõlemale poole jääv somiitide mesoderm annab aluse somiitidele, millest moodustuvad edasise arengu käigus seljas asuvad lihased. Vaheline mesoderm annab aluse urogenitaalsüsteemile, moodustades neerud, neerupealse näärme ning gonaadid ja viimastega seotud juhad. Notokordist kõige kaugemale jäävast külgplaatide mesodermist arenevad süda, veresooned ja vererakud. Külgplaatide mesodermist arenevad ka jäsemete mesodermaalsed komponendid v.a lihased. Seejuures peamesodermist moodustuvad näo sidekoed ja muskulatuur ning silmad. (Gilbert, 2010)

Mesodermaalsel diferentseerumisel osalevad samuti mitmed signaalmolekulid. Neurula staadiumi mesodermi regioonide spetsiifilisel jagunemisel osaleb signaalfaktor BMP. BMP signaalseerimine indutseerib inimese ja hiire pluripotentsete tüvirakkude diferentseerumist mesodermi, seejuures toimub see läbi BRACHYURY transkriptsioonifaktori. (Bernardo *et al.*, 2011) Seetõttu kasutatakse seda ka mesodermaalse suuna spetsiifilise markerina.

In vitro on mesodermaalset diferentseerumist embrüonaalsetest tüvirakkudest palju näidatud, seejuures on kõige paremini kirjeldatud hematopoeetilist arengut (Keller *et al.*, 2005). Hematopoeetiline diferentseerumine on saavutatud inimese embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamisel hiire luuüdi stroomarakkudega (Kaufman *et al.*, 2001) või embrüonaalsete kehade moodustamisega. Viimase puhul on diferentseerumine seerum-indutseeritud, kuid BMP4 ja VEGF ja hematopoeetiliste tsütokiinide lisamisel suureneb hematopoeetiline diferentseerumine (Cerdan *et al.*, 2004).

1.2.4. Endodermaalne diferentseerumine

Lisaks sellele, et endoderm osaleb mesodermaalse diferentseerumise signaalseerimises, annab eelmainitud looteleht aluse ka seede- ja hingamiselundkonna moodustumisele.

Ka endodermaalsel diferentseerumisel osalevad mitmed signaalmolekulid. Esmase sisemise rakumassi diferentseerumine epiblastiks ja primitiivseks endodermiks on teadaolevalt mõjutatud läbi Fgf signaalseerimise Grb2-Ras-MAP kinaasi raja kaudu (Cheng *et al.*, 1998).

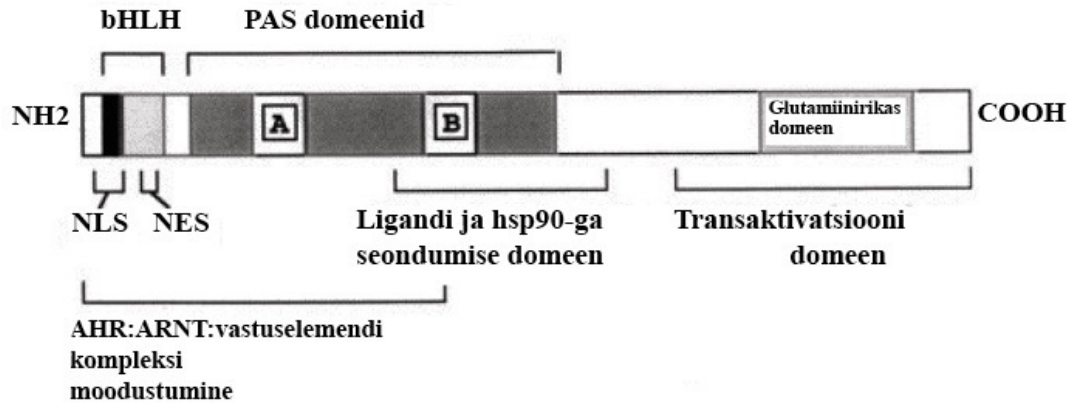
Grb2 omakorda põhjustab *Gata6* ja *Gata4* transkriptsioonifaktorite ekspressiooni sisemises rakumassis, mis indutseerivad hiljem primitiivse endodermi tekke (Chazaud *et al.*, 2006). Seejuures definitiivse endodermi, millest arenevad hiljem maks, pankreas, kopsud, kilpnääre ja soolestik (Wells *et al.*, 1999), moodustumises ja säilitamises osaleb transkriptsioonifaktor *Sox17* [*SRY (sex determining region Y)-box17*] (Kanai-Azuma *et al.*, 2002). Samuti on näidatud, et *Sox17* transkriptsioon indutseeritakse moorula ja blastotsüsti arengustaadiumite vahel, seejuures täheldati *Sox17* ekspressiooni esimest korda 32-raku staadiumis (Niakan *et al.*, 2010). Kuna *Sox17* osaleb definitiivse endodermi moodustumises, siis kasutatakse seda laialdaselt endodermaalse suuna spetsiifilise markerina.

In vitro on mitmed uuringud näidanud edusamme endodermaalse diferentseerimisega, mille puhul on saadud rakupopulatsioone, millel on täheldatud pankrease saartele (Colman *et al.*, 2004, Stoffel *et al.*, 2004) ja definitiivse endodermi rakkudele (D'Amour *et al.*, 2005) omaseid tunnuseid.

1.3. Arüülsüsivesinike retseptor

Arüülsüsivesinike retseptor (AHR – *aryl hydrocarbon receptor*) on samanimelise geeni poolt kodeeritud valk, mis kuulub heeliks-ling-heeliks (bHLH – *basic helix-loop-helix*) transkriptsioonifaktorite perekonda (NCBI d). *AHR* geen asub inimese seitsmenda kromosoomi lühikeses õlas ning temalt kodeeritakse 5 erinevat transkripti (Ensembl). Seejuures on AHR ligand-aktiveeritav ja enim tuntud kui mitmete keskkonnakemikaalide kahjutustaja (NCBI d).

Inimese AHR-il on N-terminaalses osas DNA-ga seonduv bHLH domeen, mis osaleb ka dimeriseerumises. Samuti paiknevad N-terminaalses regioonis tuuma ekspordi signaal (NES – *nuclear export signal*) ja tuuma lokalisatsiooni signaal (NLS – *nuclear localization signal*) (Ikuta *et al.*, 1998). Lisaks paikneb C-terminaalses osas glutamiinirikas transaktivatsiooni domään, mis osaleb sihtmärkgeenide transkriptsioonilisel aktiveerimisel (Kumar *et al.*, 2001). AHR-i struktuuri kuuluvad ka tandeemselt paiknevad PAS-A (PER-ARNT-SIM-A) ja PAS-B (PER-ARNT-SIM-B) domeenid. Mõlemad PAS domeenid osalevad AHR-i heterodimerisatsioonis arüülsüsivesinike retseptori tuuma lokalisaatoriga (ARNT – *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), PAS-B domeen käitub kui ligandiga seonduv domeen. (Antonsson *et al.*, 1995)



Joonis 1. AHR-i tähtsaimad domeenid. Nende hulka kuuluvad dimeriseerumises osalev bHLH domeen, NES ja NLS, ARNT-iga seonduvad PAS-A ja PAS-B domeenid ning C-terminaalses osas paiknev glutamiinirikas transaktivatsiooni domeen. (Modifitseeritud, Denison *et al.*, 2002).

Enim uuritud AHR-i ligandid on ksenobiootilised ehk sünteetilised ühendid, mille hulka kuuluvad mitmed halogeenitud aromaatsed süsivesinikud ja polütsükklilised aromaatsed süsivesinikud. Halogeenitud aromaatsete süsivesinike hulka kuuluvad bisfenüülid, polükloreeritud dibensodioksiinid ja dibensofuraanid, polütsükkliliste aromaatsete süsivesinike hulka mitmed aromaatsed amiinid, bensoflavoonid ja bensopüreen. Seejuures on suurema afiinsusega HAH rühma kuuluvad ligandid. (Safe, 1990, Poland ja Knutson, 1982, Gillner *et al.*, 1993, Kafafi *et al.*, 1993, Waller ja McKinney, 1995, Waller ja McKinney, 1992)

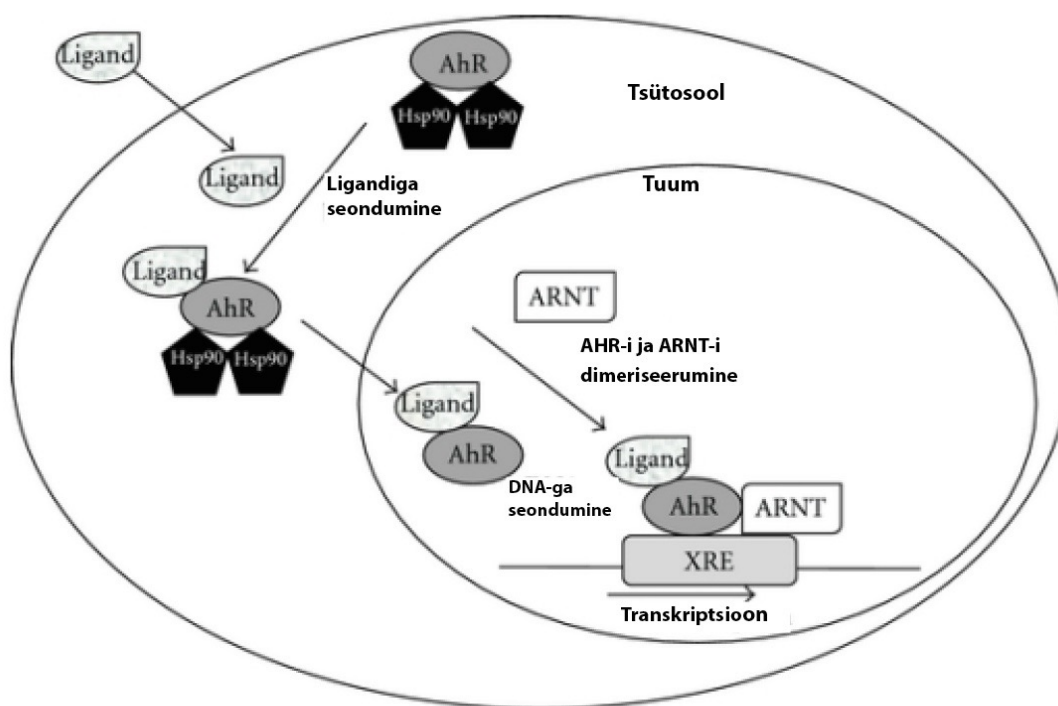
On näidatud, et lisaks ksenobiootilistele ligandidele seonduvad AHR-iga ja aktiveerivad AHR-seoselist geeniekspressiooni ka mitmesugused endogeensed molekulid.

Üheks selliseks ligandide grupiks on indooli sisaldavad kemikaalid, mille hulka kuuluvad näiteks trüptofaan ja trüptofaani derivaadid, mis aktiveerivad arüülsüsivesinike retseptori ja viimase sihtmärkgeenide ekspressiooni pärmis ja imetaja rakkudes. (Miller, 1997, Heath-Pagliuso, 1998) Lisaks trüptofaanile ja trüptofaani derivaatidele on võimelised AHR-i aktiveerima ka indooli sisaldavad indigo ja indirubiin, mida leidub näiteks inimese uriinis. (Adachi *et al.*, 2001) Ka trüptamiin, bilirubiin ja biliverdiin käituvad kui AHR-i ligandid, kuid aktiveerivad AHR-i seejuures nõrgemalt. (Phelan *et al.*, 1998)

Endogeensete füsioloogiliste AHR-i ligandide hulka kuuluvad ka prostaglandiinid, mis aktiveerivad AHR-i signaaliraja. Kuigi AHR-i ligande on leitud palju, on nende edasine uurimine huvipakkuvaks teemaks paljudele, kuna see annab võimaluse täpsemalt selgitada AHR-i füsioloogilist rolli organismis. (Seidel *et al.*, 2001)

1.3.1. Signaalirada

Enne ligandiga seondumist asub inaktiivne AHR tsütoplasmas, kus ta on kompleksis kuumašoki valguga 90 (hsp90 – *heat shock protein 90*), valguga XAP2 (*X - associated protein 2*) (Meyer *et al.*, 1998) ja *co-chaperon*'iga p23 (Kazlauskas *et al.*, 1999). Ligandiga seondumisel muudab arüülsüivesinike retseptori ja ligandi kompleks oma konformatsiooni ning translokeerub tuuma (Pollenz *et al.*, 1994). Tuumas kompleks laguneb ning AHR seondub ARNT valguga, moodustades heterodimeeri, mis on võimeline seonduma DNA-ga spetsiifilistel järjestustel (Probst *et al.*, 1993). Näiteks dioksiini puhul seondub AHR-ARNT kompleks *CYP1A1* enhanser regiooni XRE (*xenobiotic-responsive element*) järjestustele ja käitub kui transkriptsioonifaktor (Matsushita *et al.*, 1993).



Joonis 2. Arüülsüivesinike retseptori signaalirada. Enne ligandiga seondumist asub AHR tsütoplasmas, kus ta on kompleksis valkudega. Ligandiga seondumisel liigub kompleks tuuma, kus ta laguneb ning AHR moodustab kompleksi ARNT valguga. Moodustunud kompleks on võimeline seonduma DNA-ga spetsiifilises vastuselemendis. (Modifitseeritud, Callero ja Loaiza-Pérez, 2011)

Seejuures on AHR-i aktiivsus allareguleeritud AHR repressorvalgu olemasolul, mille ekspressioon omakorda on reguleeritud AHR-i enda poolt. Eelnevalt mainitud repressorvalk suudab dimeriseeruda ARNT valguga ja takistada AHR-i seondumist spetsiifilise vastuselemendiga. Selle negatiivse tagasiside meetodi lõpptulemusena inhibeeritakse ka sihtmärkgeenide ekspressioon. (Cauchi *et al.*, 2003)

1.3.2. Arüülsüsivesinike retseptori roll organismis

Lisaks sellele, et arüülsüsivesinike retseptoril on tuntud funktsioon keskkonnakemikaalide kahjutustajana, on tänaseks päevaks uuritud ka tema teisi funktsioone erinevates organismides. Näiteks on mitmetes teadusartiklites näidatud arüülsüsivesinike retseptori funktsiooni vähi tekkel, mille puhul AHR on ksenobiootiliste kemikaalide toime vahendaja, aktiveerides vastavaid sihtmärkgeene. (Morris *et al.*, 2000, Puga *et al.*, 2009) Seda näitlikustab *CYP1B1* detoksifikatsiooni geen, mis on arüülsüsivesinike retseptori poolt aktiveeritud ning mis avaldub mitmetes inimese vähikudedes nagu näiteks adenoomis (Chang *et al.*, 2005) ja kopsu adenokartsinoomis (Chang *et al.*, 2007), seejuures normaalses koes tema ekspressiooni ei täheldatud.

Teine mehhanism, millega AHR võib esile kutsuda kasvaja tekket, on anti-onkogeeni *P53* ja *BRCA1* inhibeerimine. Arvatakse, et AHR-i ligand dioksiin võib viia vähi tekkeni inhibeerides *P53* ekspressiooni ja aktivatsiooni. (Seifert *et al.*, 2009) Samuti on näidatud, et AHR on seotud *BRCA1* promootori aktivatsiooniga (Papoutsis *et al.*, 2010, Hockings *et al.*, 2006).

Kuigi ksenobiootikumide poolt indutseeritud toksilisus ja kartsinogenees on tähtsad uurimissuunad, on teadlased üritanud mõista ka selle retseptori füsioloogilist rolli organismides. Teadustööd on näidanud arüülsüsivesinike retseptori rolli ka rakkude jagunemise regulatsioonil. Näiteks on *Ahr* geeni puudumisel hiire näidatud, et hematopoeetilised tüvirakud jagunevad suurel kiirusel. Seda, et ta käitub kui rakkude jagunemise regulaator, tõestab ka see, et AHR-i antagonistid suurendavad hematopoeetiliste tüvirakkude jagunemist. Seejuures viib pikaajaline *Ahr*-i puudus kiirenenud vananemiseni, oksüdatiivse stressi ja leukeemiani. (Gasiewicz *et al.*, 2014)

Lisaks on näidatud, et AHR osaleb ka rakutsükli regulatsioonil. Roti primaarsetes hepatotsüütides ja hepatoomi rakkudes on DNA süntees inhibeeritud, kui rakkudele lisatakse AHR-i aktiveerivat ligandi dioksiini. Näidatud on ka seda, et hepatoomi rakkude

proliferatsiooni seiskumine on seotud rakutsükli peatumisega G1 faasis. (Hushka ja Greenlee, 1995)

Ahr geeni puudumisel hiire organismis on näidatud, et *Ahr* on oluline immuunsüsteemi väljakujunemisel, kuna immuunsüsteem areneb välja ebanormaalselt, seejuures on vähenenud põrna ja lümfisõlmede mass ja rakulisus. (Thurmond *et al.*, 2000, Fernandez-Salguero *et al.*, 1995)

Niisamuti on tõestatud ka seda, et arüüsüsivesinike retseptoril on füsioloogiline roll munasarja arengus, mis mõjutab hiirte reproduktiivset võimekust. *Ahr* puudulikud hiired ei ole reproduktiivselt väga võimekad ja järglaste seas on vähenenud elumus. (Abbot *et al.*, 1999) Edasised uuringud on viidanud, et see võib olla seotud muutusega hiire munasarjas paiknevate primordiaalsete folliikulite arvus ja nende moodustumises (Benedict *et al.*, 2000).

Katsed pluripotentsete hiire embrüonaalsete tüvirakkudega on näidanud, et neis puudub *Ahr*-i ekspressioon. Lisaks leiti, et pluripotentsusmarkerid Oct4, Sox2 ja Nanog repressseerivad *Ahr*-i ekspressiooni tüvirakkudes, seondudes *Ahr*-i promootorile. Rakkude diferentseerudes eemaldusid eelnimetatud pluripotentsusmarkerid promootorilt ja võimaldasid arüüsüsivesinike retseptori ekspressiooni. (Ko *et al.*, 2014) Seega on hiires arüüsüsivesinike retseptori avaldumine seotud pluripotentsuse taandumisega. Lisaks näidati hiljuti avaldatud artiklis, et inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerimisel retinoolhappega suureneb *AHR*-i ekspressioon, mis on kooskõlas eelpoolmainitud katsete tulemustega. (Cheng *et al.*, 2015)

Varasemalt on meie laboris uuritud *AHR*-i ekspressiooni ja selle ligandi ning inhibiitori mõju inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusele. Saadud tulemused näitasid, et *AHR* on hES rakkudes ekspresseeritud, kuid selle ligand ega inhibiitor ei avaldanud mõju ei inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusele ega ka rakutsükli. (Hermann, 2013)

Tuginedes eelpooltoodule, oli meie eesmärgiks uurida, kas eelnevalt hiire embrüonaalsete tüvirakkude peal nähtu on kehtiv ka inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Ajendatuna eelnevate publikatsioonide tulemustest püstitati antud töö üldiseks eesmärgiks uurida AHR-i avaldumist inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes ja nende varasel diferentseerumisel.

Sellest tulenevalt püstitati antud uurimistöös järgnevad konkreetsed eesmärgid :

1. Uurida, kas ning kuidas muutub arüüsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks.
2. Selgitada, kas ja kuidas muutub arüüsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude suunatud diferentseerumisel neuraalsesse, mesodermaalsesse ja definitiivse endodermi suunda.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed, kemikaalid ja rakuliin

Antud töös kasutati inimese embrüonaalsete tüvirakkude liini H9 (WA09) (WiCell Research Institute, National Stem Cell Bank, USA). Rakkude dissotsieerimiseks kasutati rakkude dissotsiatsiooni reagenti (STEMCELL™ Technologies, Kanada) ning nende elulemuse tõstmiseks üksikrakulisena kasvades lisati passeerimisel päeval ROCK inhibiitorit (10 µmol, Bio-Techne, USA). Rakkude pesemiseks kasutati PBS-i (Lonza Group Ltd, Šveits) ning rakkude lugemiseks hematsütomeetrit (BRAND GMBH + CO KG, Saksamaa). Embrüonaalseid tüvirakke kasvatati mTeSR™1 (STEMCELL technologies, USA) söötmes ning embrüonaalsete kehade kasvatamiseks kasutati KnockOut™ DMEM söödet, millele oli lisatud KnockOut™ Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). Lisaks kasvatati tüvirakke neuraalses, mesodermaalses ja definitiivse endodermi suunas diferentseerimiseks vastavas STEMdiff™ induktsiooni söötmes (STEMCELL™ Technologies, Kanada) vastavalt tootjapoolsetele protokollidele.

2.2.2. Rakkude kasvatamine ja diferentseerimine

Tüvirakkude kasvatamiseks kasutati Matrigel™-iga (BD Biosciences, USA) kaetud 6-kannulisi plaate. Söödet vahetati iga päev ning tüvirakke kasvatati veeauruga küllastatud koekultuuri inkubaatoris 37°C ja 5% CO₂ juures. Tüvirakke passeeriti iga 3-4 päeva tagant, passaažinumber jäi vahemikku 30-55.

Embrüonaalsete kehade saamiseks eraldati hES rakkude kolooniad manuaalselt, kraapides neid pipetiotsikuga, misjärel need tõsteti spetsiaalsesse söötmesse. Söödet vahetati iga päev ja embrüonaalsed kehad lüüsi viiendal päeval.

Neuraalseks diferentseerimiseks pesti hES rakke 2 ml steriilse PBS-iga. Sellele järgnevalt lisati rakkudele 1 ml rakkude dissotsiatsiooni reagenti ja inkubeeriti koekultuuri inkubaatoris 8-10 minutit. Seejärel rakke suspendeeriti, tõsteti DMEM/F-12 söödet sisaldavasse tuubi ning kanne pesti 2 ml DMEM/F-12 söötmega. Rakke tsentrifuugiti 300 x g juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti STEMdiffTM neuraalse induktsiooni söötmes, millesse oli eelnevalt lisatud ROCK inhibiitorit (10 µM), millele järgnes rakkude loendamine hematsütomeetriga. Seejärel lisati 250 000 rakku MatrigelTM-iga kaetud 6-kannulise plaadi kannule ning asetati koekultuuri inkubaatorisse 37°C juurde. STEMdiffTM neuraalse induktsiooni söödet vahetati igapäevaselt. Viiendal päeval, kui rakud olid 80-90% konfluentsed, need lüüsi.

Definiitivse endodermi diferentseerimiseks pesti hES rakke 2 ml PBS-iga. Sellele järgnevalt lisati rakkudele 1 ml rakkude dissotsiatsiooni reagenti ja inkubeeriti koekultuuri inkubaatoris 8-10 minutit. Seejärel rakke suspendeeriti, tõsteti DMEM/F-12 söödet sisaldavasse tuubi ning kanne pesti 2 ml DMED/F-12 söötmega. Rakke tsentrifuugiti 300 x g juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti mTeSRTM1 söötmes, millesse oli eelnevalt lisatud 10 µM ROCK inhibiitorit (10 µM), millele järgnes rakkude loendamine hematsütomeetriga. Seejärel külvati 600 000 rakku MatrigelTM-iga kaetud 6-kannulise plaadi kannule ning asetati koekultuuri inkubaatorisse 37°C juurde 24 tunniks.

Diferentseerimise esimesel päeval pesti rakke DMEM/F-12 söötmega ning rakkudele lisati STEMdiffTM basaalsööde koos lisand A-ga (vastavalt suhtega 1:100). Järgnevatel päevadel lisati rakkudele STEMdiffTM basaalsööde koos lisand A ja B-ga (vastavalt suhtega 1:100) ning viiendal päeval rakud lüüsi.

Mesodermaalseks diferentseerimiseks pesti hES rakke 2 ml PBS-iga. Sellele järgnevalt lisati 1 ml rakkude dissotsiatsiooni reagenti ja inkubeeriti koekultuuri inkubaatoris 8-10 minutit. Seejärel rakke suspendeeriti, tõsteti DMEM/F-12 söödet sisaldavasse tuubi ning kanne pesti 2 ml DMEM/F-12 söötmega. Rakke tsentrifuugiti 300 x g juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti mTeSRTM1 söötmes, millesse oli eelnevalt lisatud ROCK inhibiitorit (10 µM), millele järgnes rakkude loendamine hematsütomeetriga. Seejärel lisati 250 000 rakku MatrigelTM-iga kaetud 6-kannulise plaadi kannule ning asetati koekultuuri inkubaatorisse 37°C

juurde 24 tunniks. Esimesel diferentseerimise päeval lisati rakkudele 2 ml STEMdiff™ mesodermaalset induktsiooni söödet, mida vahetati igapäevaselt. Viiendal päeval rakud lüüsi.

2.2.3. RNA eraldamine

Rakud lüüsi ja RNA eraldati FavorPrep™ RNA eraldamise komplektiga (Favorgen Biotech Corp, Taiwan) vastavalt tootjapoolsele protokollile.

Rakkudele lisati 350 µl FARB puhvrit ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Lüsaat FARB puhvris kanti edasi filterkolonnile ja seda tsentrifuugiti 10 000 x g juures 2 minutit. Puhastatud supernatant kanti mikrotsentrifuugi tuubi ning sellele lisati 1 volüüm (350 µl) 70% etanooli. Etanooliga proov viidi FARB minikoloni ning viimast tsentrifuugiti 10 000 x g juures 1 minut. Supernatant visati minema ning FARB minikoloni filtrile lisati 500 µl pesupuhvrit 1, mis seejärel tsentrifuugiti 10 000 x g juures 1 minut. Seejärel pesti FARB minikoloni 2 korda pesupuhvriga 2 ning tsentrifuugiti 10 000 x g juures 1 minut. Supernatant visati minema ning FARB minikoloni tsentrifuugiti lisaks 3 minutit 10 000 x g juures. FARB minikoloni filter asetati elueerimistuubi ning minikoloni filtri keskele lisati 30 µl RNAasi-vaba vett, millel lasti seejärel seista 1 minut ning tsentrifuugiti 2 minutit 10 000 x g juures. Eraldatud RNA säilitati -80°C juures.

2.2.4. mRNA spetsiifilise cDNA süntees

RNA kontsentratsiooni mõõdeti masinaga Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Komplementaarse DNA ahela sünteesiks RNA-st viidi läbi pöördtranskriptsioon, kasutades cDNA sünteesi komplekti Thermo kit K1622 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), millele eelnes DNAasi (Thermo Scientific, USA) töötlus. Selleks segati kokku reaktsioonisegu mahuga 10 µl, mis sisaldas mRNA-d, 10-kordset reaktsioonipuhvrit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 1 ühikut DNAasi (Thermo Scientific, USA), 20 ühikut Ribolocki (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ja vett. Reaktsioonisegu viidi Applied Biosystems™ 2720 termotsüklerisse (Thermo Scientific Inc., USA), kus seda inkubeeriti 37°C juures 30 minutit. Seejärel lisati reaktsioonisegule 1 µl 50 mM EDTA ning seda inkubeeriti 65°C juures 10 minuti jooksul termotsükleris. cDNA sünteesi jaoks lisati reaktsioonisegule reaktsioonipuhvrit (1x), dNTP (1mM) ja praimerite segu (5 µM), Ribolocki (20U) ning M-MuLV revertaasi (200U). Saadud seguga viidi termotsükleris läbi pöördtranskriptsioon. Praimerite ja RNA matriitsi seondumise maksimeerimiseks viidi termotsükler 25°C juurde 10 minutiks. Sellele järgnevalt toimus cDNA süntees 42°C juures 60 minutit ning revertaasi inaktivatsioon 70°C juures 10 minutit.

2.2.5. Kvantitatiivne PCR (qPCR)

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR – *quantitative polymerase chain reaction*) läbiviimiseks segati kokku reaktsioonisegu lõppmahus 10µl, mis koosnes 5 µl Maxima SYBR green-i (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), vastavatest päri- ja vastassuunaliste praimerite segust ning 5 µl cDNA-st. Reaktsioonisegu kanti 384-kannulisele qPCR-i plaadile ning viidi kvantitatiivse PCR-i läbiviimiseks LightCycler® 480 Instrument II masinasse (Roche, Šveits), kasutades tabelis 1 toodud programmi.

Tabel 1. Kvantitatiivse PCR-i programm

	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Algne denaturatsioon	95°C	10 minutit	1
Denaturatsioon	95°C	15 sekundit	40
Praimerite seondumine ja süntees	59°C	60 sekundit	
Sulamiskõver	45-95°C	7 minutit	1

qPCR-is kasutatud praimerid :

hAHR_F: 5'- ATTACAGGCTCTGAATGGCTTTG -3'

hAHR_R: 5'- TGACATCAGACTGCTGAAACCCTAG -3'

hOCT4_F: 5'- CTGGAGCAAAACCCGGAGG -3'

hOCT4_R: 5'- CCTCAAAGCGGCAGATGGTC -3'

hTOP1_F: 5' -TCCGGAACCAGTATCGAGAAGA- 3'

hTOP1_R: 5' -CCTCCTTTTCATTGCCTGCTC- 3'

hPOLR2A_F: 5'- TCCAGTTCGGAGTCCTGAGT -3'

hPOLR2A_R: 5'- ACACTCTGTCATGTTTCCTGC -3'

2.2.6. Pöördtranskriptsioon-PCR (RT-PCR)

Pöördtranskriptsioon polümeraasi ahelreaktsiooni (RT-PCR – *reverse transcription polymerase chain reaction*) läbiviimiseks segati kokku reaktsioonisegu lõppmahus 10µl, mis

koosnes vastavatest päri- ja vastassuunaliste praimerite, vee ja 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne, Eesti) segust ning 5µl cDNA-st. Saadud seguga viidi läbi RT-PCR Applied Biosystems™ 2720 termotsükleris tabelis 2 toodud programmi järgi.

Tabel 2. Pöördtranskriptsioon-PCR-i programm

	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Algne denaturatsioon	95°C	5 minutit	1
Denaturatsioon	94°C	30 sekundit	25
Praimerite seandumine	60°C	30 sekundit	
Elongatsioon	72°C	30 sekundit	
Lõplik elongatsioon	72°C	5 minutit	1

Pöördtranskriptsioon-PCR-is kasutatud praimerid:

hOTX2_F: 5'- GCTGGCTATTTGGAATTTAAAGG -3'

hOTX2_R: 5'- GGGTTTGGAGCAGTGGAAC -3'

hBRACHYURY_F: 5'- ATGACAATTGGTCCAGCCTT -3'

hBRACHYURY_R: 5'- CGTTGCTCACAGACCACAG -3'

hSOX17_F: 5'- GGCGCAGCAGAATCCAGA -3'

hSOX17_R: 5'- CCACGACTTGCCCAGCAT -3'

hPOLR2A_F: 5'- TCCAGTTCGGAGTCCTGAGT -3'

hPOLR2A_R: 5'- ACACTCTGTCATGTTTCCTGC -3'

2.2.7. Geelelektroforees

cDNA lahutamiseks geelelektroforeesil valmistati agarosgeel (2%) TAE puhvris. Agarosgeelile lisati 7µl etiidiumbromiidi, millele järgnevalt valati geel geelelektroforeesi vanni ning seda hoiti jahutamiseks 4°C juures 15 minutit. Proovid kanti geelile ning geelelektroforees viidi läbi 110 V juures 1,5 tunni jooksul Owl™ EasyCast™ B2 Mini Gel Electrophoresis masinaga (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Fragmentide detekteerimine ja pildistamine toimus GelDoc-It^e Imaging Systems (UVP Analytik Jena Company, Saksamaa) masinaga vastava analüüsiprogrammiga.

2.2.8. SDS-PAGE ja Western blotting

Valkude eraldamiseks lüüsi rakud RIPA puhvris (50 mM Tris pH 7.4, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS). Seejärel tsentrifuugiti valgulüsaate 10 minutit 13 000 x g juures ning mõõdeti valgu kontsentratsioone 562 nm lainepikkuse juures Pierce™ BCA valgu kontsentratsiooni mõõtmise komplektiga (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) 1-kordse ja 5-kordse lahjendustena, kasutades Multiskan Ascent aparati (Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Valgulüsaatidele lisati DTT (100 µmol, PanReac AppliChem, Saksamaa) ja 5-kordne laadimispuhver (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ning saadud segu hoiti 5 minutit 95°C juures termostaadis. Lüsasid kanti 10% SDS-polüakrüülamiid-elektroforeesgeelile (SDS-PAGE – *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*). Valgud lahutati geelil 45 minutit 50 V juures ja ühe tunni jooksul 170 V juures Mini-PROTEAN® Tetra Cell masinaga (Bio-Rad, USA). Elektroforeesi lõppedes viidi nii eelnevalt metanooli kastetud polüvinülideen difluoriid (PVDF – *Polyvinylidene difluoride*) membraanid kui geelid ülekandepuhvrissse (192 mM glütsiin, 0,1% SDS, 25mM Tris-HCl pH 8.3, 10% metanool), mis asetati viieks minutiks loksutile. Valgud kanti geelilt Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA) masinaga üle PVDF membraanidele 15 V juures 17 minuti jooksul. Peale ülekannet loputati PVDF membraanid TBST-s (0,1 % Tween 20, 0,15 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5), millele järgnevalt PVDF membraanid blokeeriti ebaspetsiifilise seondumise vähendamiseks 1 tunni jooksul TBST lahuses, mis sisaldas 5% lõssipulbrit. Seejärel inkubeeriti membraane üleöö vastavates primaarsetes antikehades. Sellele järgnevalt pesti membraane 4 korda 6 minutit ja 1 korda 9 minutit TBST-s. Järgnevalt inkubeeriti membraane sekundaarsete antikehadega 1 tund. Seejärel pesti membraane jälle 4 korda 6 minutit ja 1 korda 9 minutit TBST-s. Kasutades Immobilon Western Chemiluminescent HRP substraati (Merck Millipore, Saksamaa) segati kokku reaktsioonisegu, mis kanti membraanidele. Reaktsioonisegu inkubeeriti 5 minutit ning signaale detekteeriti röntgenfilmil (Agfa, Belgia), mis viidi edasi ilmutisse ja kinnistisse (Agfa, Belgia). Densitomeetrilise analüüsi läbiviimiseks kasutati UVP tarkvara (UVP Analytik Jena Company, Saksamaa).

Kasutatud primaarsed antikehad:

- a) AHR-i vastane küüliku polükloonaalne antikeha, BML-SA210-0100, 1:5000 (Enzo Life Sciences, Taani)
- b) Aktiini vastane küüliku polükloonaalne antikeha, sc-1616-R, 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

c) OCT4 vastane hiire monoklonaalne antikeha, sc-5279, 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Kasutatud sekundaarsed antikehad:

a) Küüliku vastane kitse antikeha, sc-2004, 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

b) Hiire vastane kitse antikeha, sc-2005, 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

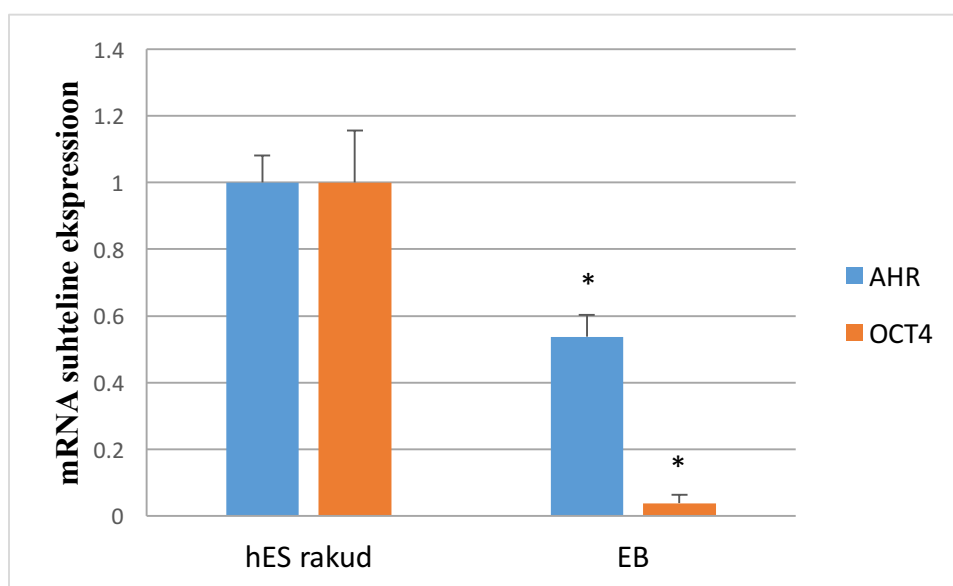
2.2.9. Andmete statistiline analüüs

Kõiki katseid viidi läbi kolmes korduses, misjärel leiti tulemuste aritmeetiline keskmine ning nende statistiline analüüs viidi läbi MS Exceli abil. Tulemused on esitatud korduste aritmeetilise keskmisena, millele on märgitud veapiirid standardvea näol. Tulemuste statistiline olulisus on leitud MS Exceli t-testi abil, seejuures on statistilise olulisuse nivooks võetud $p < 0,05$.

2.3. Tulemused

2.3.1. *AHR*-i mRNA ekspressioon embrüonaalsetes kehaes

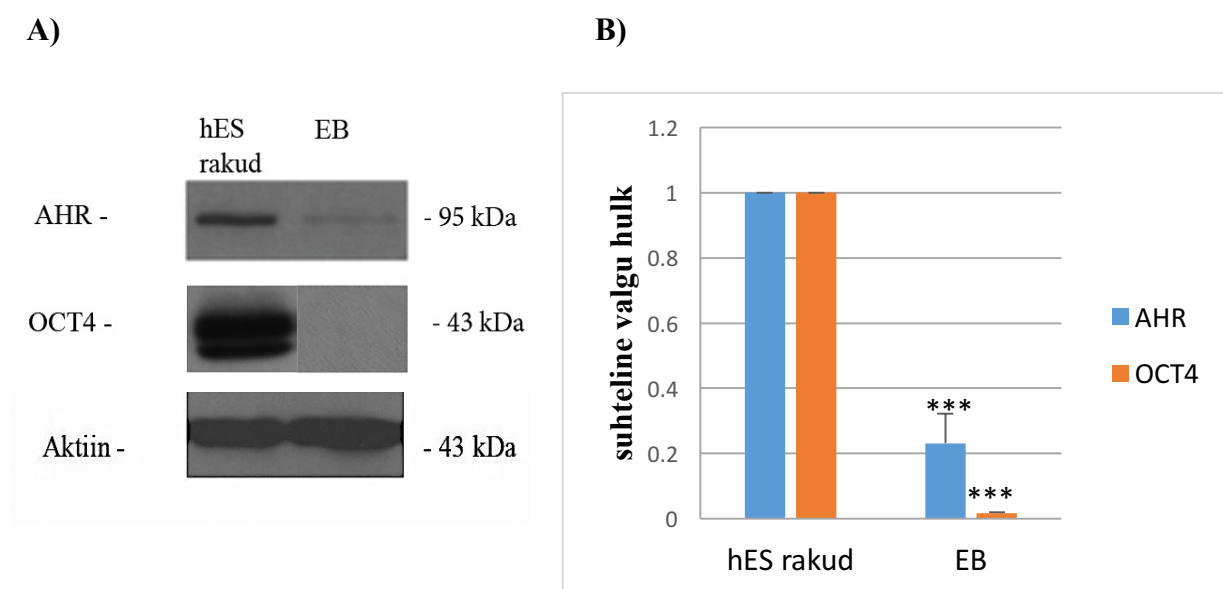
Eelnevalt on teada, et hES rakkudes on *AHR* ekspresseeritud (Hermann, 2013), kuid see, kas selle ekspressioon võiks muutuda diferentseerumise käigus, on siiani lõplikult välja selgitamata. Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli selgitada, kas *AHR*-i ekspressioon võiks muutuda inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehaes. Selleks passeeriti hES rakud suspensioonkultuuri, kus embrüonaalsetel kehaes lasti moodustuda ning 5 päeva kasvada, misjärel need lüüsi RNA ja valgu saamiseks vastavates puhvrites. Seejärel viidi läbi qPCR spetsiifiliste praimeritega, et hinnata *AHR*-i ekspressiooni mRNA tasemel, kasutades endogeense kontrollina *RNA polümeraas II subühik A* [*POLR2A* – *polymerase (RNA) II subunit A*], kui pole mainitud teisiti. Rakkude diferentseerumise kirjeldamiseks analüüsi pluripotentsusmarkeri *OCT4* ekspressiooni muutust spetsiifiliste praimeritega. Tulemustest selgus, et arüüsivesinike retseptori ekspressioon väheneb hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehaes ligikaudu 45% võrra ($p < 0,05$) (joonis 3). Samuti täheldati *OCT4* ekspressiooni olulist langust, mis tõendab diferentseerumise toimumist ($p < 0,05$) (joonis 3).



Joonis 3. *AHR*-i ja *OCT4* mRNA ekspressiooni muutus hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehaes (EB). *AHR*-i ja *OCT4* mRNA ekspressiooni analüüsi qPCR meetodil spetsiifiliste praimeritega (* $p < 0,05$).

2.3.2. AHR-i suhteline valgu kogus embrüonaalsetes kehaades

Kuna leidsime, et *AHR*-i mRNA ekspressioon väheneb inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel, tekkis järgnevalt huvi uurida *AHR*-i ekspressiooni ka valgu tasemel. Selleks teostati SDS-PAGE ja Western Blot analüüs *AHR*-i, OCT4 ja aktiini vastaste antikehadega. Tulemustest selgus, et ka valgu tasemel langeb *AHR*-i ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks (joonis 4a). Et ilmetada korduskatsetes saadud Western Bloti tulemusi, viidi läbi ka densitomeetriline analüüs UVP tarkvaraga. Saadud tulemustest selgus, et suhteline *AHR*-i valgu hulk hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks vähenes ligikaudu 70%, samal ajal kui suhteline OCT4 valgu hulk vähenes ligikaudu 98% ($p < 0,001$) (joonis 4b).

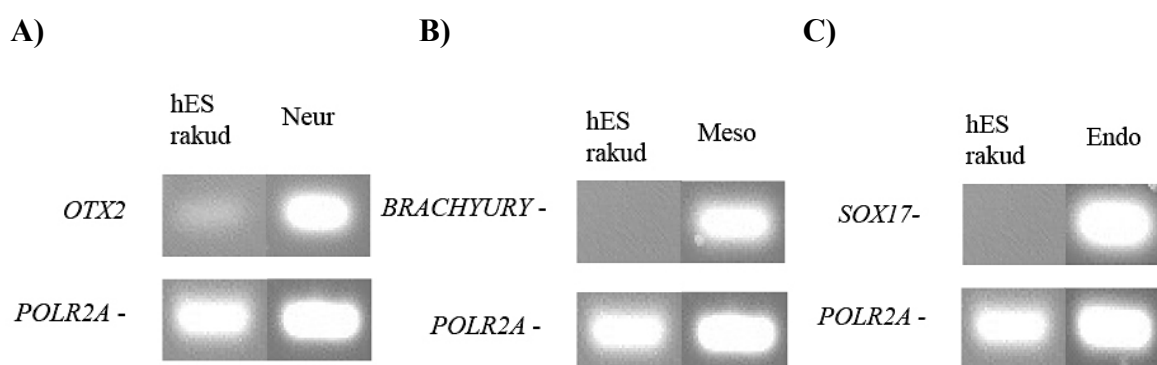


Joonis 4. AHR-i ja OCT4 suhteline valgu hulga muutus hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks. A) Western Blot analüüs hES rakkudest ja embrüonaalsetest kehade (EB) AHR-i, aktiini ja OCT4 vastaste antikehadega. B) Western Blottide densitomeetriline analüüs, mis näitab suhtelist AHR-i ja OCT4 valgu hulga muutust hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks (EB) (***) ($p < 0,001$).

Saadud tulemused kinnitavad asjaolu, et arüülsüivesinike retseptori ekspressioon väheneb oluliselt hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks nii mRNA kui valgu tasemel.

2.3.3. Indutseeritud diferentseerimise suunaspetsiifilisuse kontroll

Embrüonaalsed kehad koosnevad heterogeensest rakupopulatsioonist, mis tähendab seda, et neis on esindatud kõigi kolme lootelehe rakud. Seetõttu tekkis järgnevalt huvi uurida, kas *AHR*-i ekspressiooni vähenemine on seotud üldiselt diferentseerumisega või on see mõne arengusuuna spetsiifiline. Selleks võeti kasutusele kommertsiaalsed neuraalsete eellasrakkude, varajase mesodermi ning definitiivse endodermi diferentseerimissöötmel, mille funktsionaalsust esmalt testiti. hES rakke diferentseeriti 5 päeva vastava suuna spetsiifilise STEMdiffTM induktsiooni söötmes, misjärel rakud lüüsi RNA eraldamiseks vastavas puhvris. Et kontrollida, kas diferentseerumine neuraalsesse, mesodermaalsesse ja definitiivse endodermi suunda on toimunud, teostati kõigepealt RT-PCR suunaspetsiifiliste praimeritega (vastavalt *OTX2*, *BRACHYURY* ning *SOX17*) ning proovid lahutati geelelektroforeetilisel. Tulemustest selgus, et kõik suunaspetsiifilised markerid on diferentseeritud rakkudes võrreldes pluripotentsete hES rakkudega väga tugevalt ekspresseeritud, mis tõestab, et rakkude spetsiifiline diferentseerumine on toimunud (joonis 5).

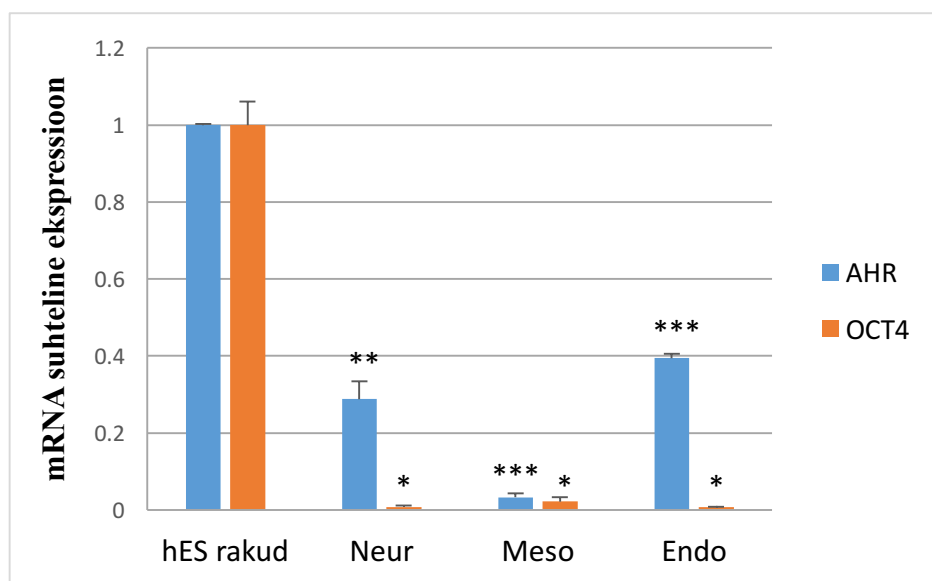


Joonis 5. *OTX2*, *BRACHYURY*, *SOX17* ja *POLR2A* ekspressioon hES rakkudes ja diferentseeritud rakkudes. RT-PCR analüüs hES ja diferentseeritud rakkudest neuraalse (A) (Neur), mesodermaalse (B) (Meso) ja definitiivse endodermi (C) (Endo) suuna spetsiifiliste praimeritega.

2.3.4. *AHR*-i mRNA ekspressioon suunaspetsiifiliselt diferentseeritud rakkudes

Järgneva töö eesmärgiks oli teada saada, kuidas muutub *AHR*-i mRNA ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ja definitiivse endodermi rakkudeks. Selle eesmärgi saavutamiseks viidi läbi qPCR *AHR*-i spetsiifiliste praimeritega. Tulemustest selgus, et arüülsüivesinike retseptori ekspressioon väheneb hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks ligikaudu

70% ($p < 0,01$) (joonis 6). Diferentseerumisel varajase mesodermi rakkudeks väheneb arüülsüivesinike retseptori ekspressioon ligikaudu 95%, definitiivse endodermi rakkudes seevastu nähti *AHR*-i mRNA ekspressiooni 60%-list langust ($p < 0,001$) (joonis 6). Samuti hinnati diferentseerumise kontrolliks pluripotentsusmarkeri *OCT4* ekspressiooni muutust. Täheledatai ka *OCT4* mRNA ekspressiooni olulist langust diferentseeritud rakkudes, mis kinnitab siinkohalgi diferentseerumise toimumist ($p < 0,05$) (joonis 6).

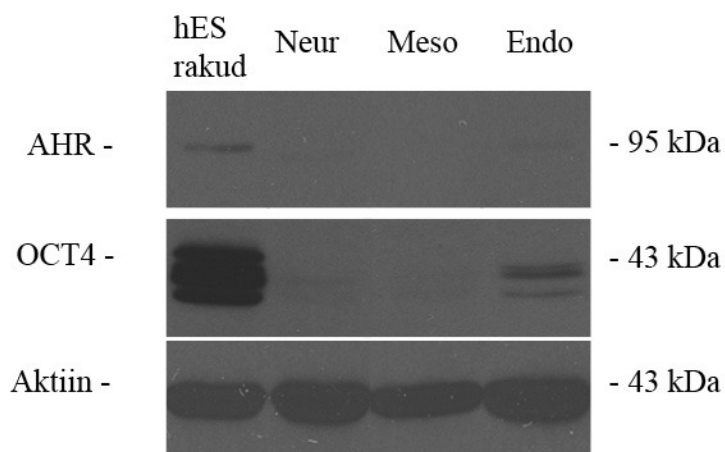


Joonis 6. *AHR*-i ja *OCT4* mRNA ekspressiooni muutus hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks (Neur), varajase mesodermi (Meso) ning definitiivse endodermi rakkudeks (Endo). *AHR*-i ja *OCT4* mRNA ekspressiooni analüüsiti qPCR meetodil spetsiifiliste praimeritega (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

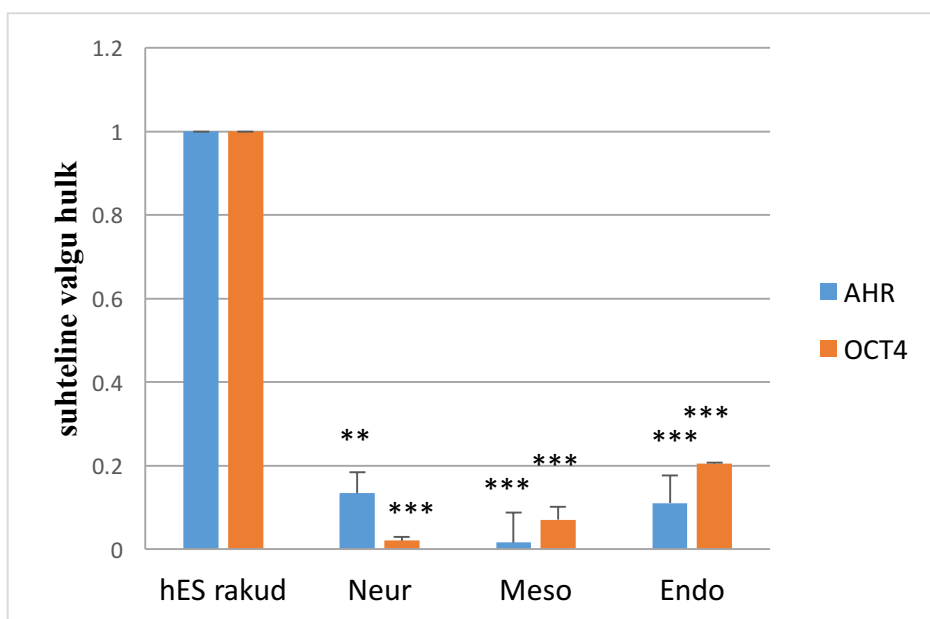
2.3.5. *AHR*-i valgu suhteline kogus suunaspetsiifiliselt diferentseeritud rakkudes

Kuna nägime, et meie poolt diferentseeritud rakkudes väheneb arüülsüivesinike retseptori ekspressioon mRNA tasemel, teostati järgnevalt valgulüsaatidega Western Blot analüüs *AHR*-i ja aktiini vastaste antikehadega, et uurida, kuidas muutub *AHR*-i suhteline valgu kogus hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ja definitiivse endodermi rakkudeks. Diferentseerumise kontrolliks kasutati Western Blot analüüsil ka *OCT4* vastast antikeha. Tulemustest selgus, et nii *AHR*-i kui *OCT4* avaldumine on ka valgu tasemel alla reguleeritud inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ja definitiivse endodermi rakkudeks (joonis 7a).

A)



B)

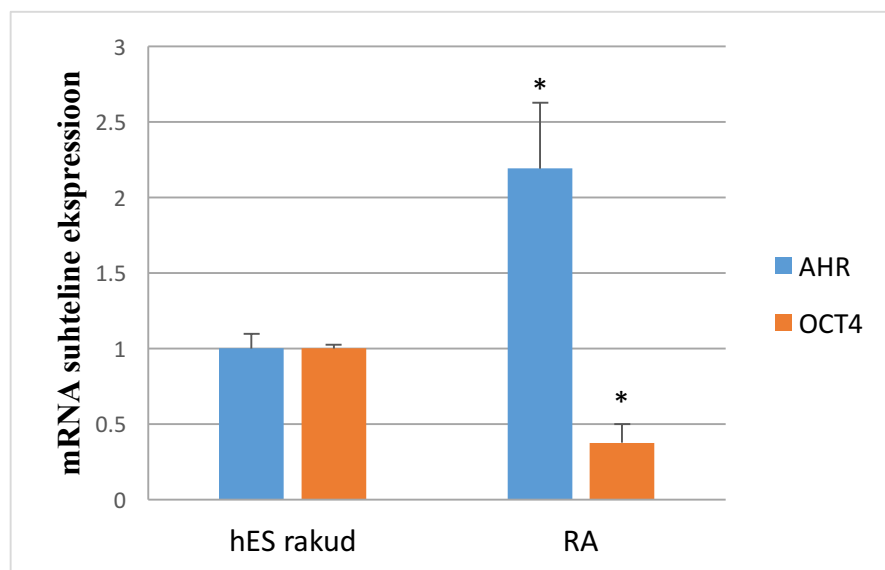


Joonis 7. AHR-i ja OCT4 suhteline valgus hulk muutus hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ning definitiivse endodermi rakkudeks. A) Western Blot analüüs hES rakkudest, neuraalsetest eellasrakkudest (Neur), varajase mesodermi (Meso) ning definitiivse endodermi rakkudest (Endo) AHR-i, aktiini ja OCT4 vastaste antikehadega. B) Western Blottide densitomeetriline analüüs, mis näitab suhtelist AHR-i ja OCT4 valgus hulga muutust hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks (Neur), varajase mesodermi (Meso) ja definitiivse endodermi (Endo) rakkudeks (** p < 0,01; *** p < 0,001).

Et paremini ilmestada Western Blot analüüside tulemusi, viidi läbi ka densitomeetriline analüüs. Selle tulemusena leiti, et AHR-i valgu suhteline hulk vähenes ligikaudu 85% hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi rakkude puhul ligikaudu 98% ja definitiivse endodermi rakkudes ligikaudu 90% (vastavalt $p < 0,01$; $p < 0,001$ ja $p < 0,001$) (joonis 7b). Densitomeetrilise analüüsi tulemustest selgus veel, et hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ja definitiivse endodermi rakkudeks väheneb OCT4 valgu suhteline hulk ligikaudu 95%, mis tõestab veelkord diferentseerumise toimumist ($p < 0,001$) (joonis 7b).

2.3.6. AHR-i ekspressioon retinoolhappega töödeldud diferentseeruvates rakkudes

Eelnevalt on näidatud, et H1 inimese embrüonaalsete tüvirakkude liini diferentseerimisel retinoolhappega *OCT4* ekspressioon väheneb, samal ajal kui *AHR*-i ekspressioon kasvab (Cheng *et al.*, 2015). Kuna eelnevate katsete tulemustes nägime, et kõikides suundades diferentseeritud rakkudes *AHR*-i ekspressioon siiski langeb nii mRNA kui ka valgu tasemel, tekkis edasine huvi uurida, kas teistes publitseeritud teadustöodes esinev ekspressiooni tõus võib olla tingitud erinevast rakuliinist või on see spetsiifiline retinoolhappe töötlusele. Selleks kasutati eelnevalt meie uurimisgrupis retinoolhappega töödeldud rakkude RNA-d (Pook, 2015) ning viidi läbi kvantitatiivne PCR spetsiifiliste praimeritega. Kvantitatiivse PCR-i läbiviimiseks kasutati endogeense kontrollina *topoisomeraas 1*. Samuti hinnati diferentseerumise kontrolliks pluripotentsumarkeri *OCT4* ekspressiooni muutust spetsiifiliste praimeritega. Tulemustest selgus, et võrreldes pluripotentsete tüvirakkudega tõuseb *AHR*-i ekspressioon retinoolhappega diferentseeritud rakkudes umbes 2,2 korda ($p < 0,05$) (joonis 8). Seejuures täheldati *OCT4* ekspressiooni olulist langust hES rakkude töötlemisel retinoolhappega, mis viitab diferentseerumise toimumisele ($p < 0,05$) (joonis 8).



Joonis 8. *AHR*-i ja *OCT4* mRNA ekspressiooni muutus hES rakkude töötlusel retinoolhappega (RA). *AHR*-i ja *OCT4* mRNA ekspressiooni analüüsi qPCR meetodil spetsiifiliste praimeritega (* $p < 0,05$).

2.4. Arutelu

Arüülsüivesinike retseptor on muuhulgas teadaolevalt oluline hematopoeetiliste tüvirakkude regulaator, omades rolli nende jagunemisel. Samuti on näidatud, et pikaajaline *Ahr*-i puudus viib oksüdatiivse stressi ja leukeemiani. (Gasiewicz *et al.*, 2014) Seejuures on aga vähe uuritud *Ahr*-i olulisust pluripotentsetes embrüonaalsetes tüvirakkudes ja nende diferentseerumisel. Eelnevalt on näidatud, et hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes represseerivad pluripotentsusmarkerid Oct4, Sox2 ja Nanog *Ahr*-i ekspressiooni ning tüvirakkude diferentseerumisel ja pluripotentsuse taandumisel aktiveerub *Ahr*-i ekspressioon (Ko *et al.*, 2014).

Inimese embrüonaalsete tüvirakkude ja *AHR*-i vaheliste seoste kohta teadaolevalt andmed aga praktiliselt puuduvad. Varasemalt on vaid näidatud, et *AHR* ekspresseerub inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes (Hermann, 2013) ning et *AHR* käitub kui pluripotentsuse inhibeeriija, seondudes *OCT4* promooterile ja represseerides viimase ekspressiooni (Cheng *et al.*, 2015).

Ajendatuna eelnevast, tekkis huvi uurida, kas ning kuidas muutub arüülsüivesinike retseptori ekspressioon hES rakkude spontaansel diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks ja spetsiifilisel diferentseerimisel komertsiaalsete söötmetega. Antud bakalaureusetöö tulemustest selgus, et arüülsüivesinike retseptor on erinevalt hiire embrüonaalsetest tüvirakkudest ekspresseeritud ka pluripotentsetes inimese tüvirakkudes, kusjuures selle ekspressioon on tugevalt alla reguleeritud hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks nii mRNA kui ka valgu tasemel. Seega toimus erinevalt eelnevalt näidatud resultaatidest koos pluripotentsuse taandumisega hoopis *AHR*-i ekspressiooni vähenemine.

Embrüonaalsed kehad koosnevad heterogeensest rakupopulatsioonist, mis tähendab, et neis on esindatud erinevatesse arengusuundadesse diferentseerunud rakud. Seega oli järgmiseks eesmärgiks selgitada, kas *AHR*-i regulatsioon hES rakkude diferentseerumisel on üldine või on see mõne suuna spetsiifiline. Sellest tulenevalt diferentseeriti hES rakke komertsiaalsete söötmetega neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ning definitiivse endodermi rakkudeks. Kooskõlas eelnevate katsetega, mis teostati embrüonaalsete kehadega, märgati sellelgi korral *AHR*-i ekspressiooni olulist vähenemist ning seda nii mRNA kui ka valgu tasemel. Seejuures näib *AHR*-i transkriptide hulga langus nii embrüonaalsetes kehaes, neuraalsete eellasrakkude ja definitiivse endodermi puhul sarnane, kuid varajase mesodermi rakkudes on *AHR*-i ekspressioon tugevamalt alla reguleeritud. Kuigi nende erinevuste põhjus

ja funktsionaalsed rollid jäid antud bakalaureusetöös selgitamata, on tulevastes katsetes selle selgitamine üheks peamiseks eesmärgiks. Näiteks oleks huvitav uurida, kas mRNA hulga varieeruvus võib olla põhjustatud erinevast transkriptsioonimäärast või on selle põhjuseks erinevad post-transkriptsioonilised mehhanismid. Eelnevalt on näidatud, et *AHR*-i negatiivses regulatsioonis võivad osaleda miRNA-124 (Huang *et al.*, 2011) ning miRNA-203 (Li *et al.*, 2013), mis inhibeerivad *AHR*-i ekspressiooni. Hoolimata erinevusest mRNA ekspressioonis, näitas Western Blottide densitomeetriline analüüs, et valgu tasemel olulisi erinevusi eri suundade vahel ei ole. Tuginedes eelnevalt avaldatud teadustöödele võib see aga olla põhjustatud vähenenud *AHR*-i stabiilsusest ning suurenenud degradatsioonist ubikvitiin-proteasoomi signaalraja poolt. (Ma *et al.*, 2000)

Eelnevalt on näidatud, et H1 inimese embrüonaalsete tüvirakkude liini diferentseerimisel retinoolhappega *OCT4* ekspressioon väheneb, samal ajal kui *AHR*-i ekspressioon kasvab. Seejuures seondus *AHR* *OCT4* promootorile ning inhibeeris selle ekspressiooni tüvirakulaadsetes kasvajarakkudes. (Cheng *et al.*, 2015) Seetõttu tekkis edasine huvi uurida, kas ka H9 rakuliinis võiks retinoolhape suurendada *AHR*-i ekspressiooni. Sellest tulenevalt viidi antud bakalaureusetöös läbi analüüsid varasemalt meie uurimisgrupis retinoolhappega töödeldud rakkude RNA-ga (Pook, 2015). Sarnaselt H1 rakuliinile täheldati *AHR*-i ekspressiooni tõusu. hES rakkude diferentseerimisel on väga tähtis diferentseerimisel saavutatava arengustaadiumi defineerimine. Nimelt meie poolt kasutatud kommertsiaalsete söötmetega diferentseeruvad hES rakud neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ning definitiivse endodermi rakkudeks. Seevastu retinoolhappe puhul on erinevad teadustööd näidanud varieeruvaid ning vastakaid tulemusi. Meie poolt kasutatud RNA-de puhul on eelnevalt näidatud, et retinoolhappega töötlemisel diferentseeruvad hES rakud mesendodermi, ekspresseerides viimasele omaseid geneetilisi markereid (Pook, 2015). Seetõttu on alust arvata, et retinoolhappega diferentseerides saavutatakse diferentseerumise varasem faas, kus *AHR*-i ekspressioon on üles reguleeritud. Seega pole välistatud, et *AHR*-i ekspressiooni suurenemine toimus ka teistes meie poolt läbiviidud katsetes, kuid varasemal ajahetkel. Viimase väljaselgitamiseks oleks väga huvitav edaspidi analüüsida diferentseerumise erinevaid etappe sõltuvalt diferentseerimise ajast.

Tuginedes eelpooltoodule, on selge, et edasisel diferentseerumisel neuraalsesse, mesodermaalsesse ja endodermaalsesse suunda *AHR*-i ekspressioon reguleeritakse taas alla. See võib omakorda olla seotud mõne arengus olulise protsessiga. Kuigi käesoleva töö jooksul pole *AHR*-i funktsionaalset tähtsust uuritud, on see tulevaste katsete üheks peamiseks

eesmärgiks. Varasemalt on näidatud, et AHR on võimeline indutseerima miRNA-302 ekspressiooni ning seeläbi soodustama somaatiliste rakkude repogrammeerimist (Hu *et al.*, 2013). Üheks võimalikuks seletuseks on see, et varases diferentseerumise faasis on *AHR*-i ekspressiooni suurenemine seotud *OCT4* represseerimisega. Hilisem allaregulatsioon võiks aga ära hoida rakkude repogrammeerimist ehk pluripotentsuse taastamist. See hüpotees vajab aga veel tõestamist.

Kokkuvõtteks võib öelda, et käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et arüüsüsivesinike retseptori ekspressioon väheneb embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks ning tüvirakkude indutseeritud diferentseerimisel neuraalsesse, mesodermaalsesse ja definitiivse endodermi suunda. Kuna eelnevalt publitseeritud teadustöodes pole selliseid tulemusi kajastatud ning antud teema on nii inimese embrüonaalsete tüvirakkude regulatsioonimehhanismide kui ka nende modifitseerimise seisukohalt väga oluline, on käesoleva töö tulemused unikaalsed ja aluseks edasistele uuringutele.

KOKKUVÕTE

Antud bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldati inimese embrüonaalseid tüvirakke ning nende omadusi. Lisaks anti ülevaade põhilistest pluripotentsuse säilitamisel osalevatest pluripotentsusmarkeritest. Samuti kirjeldati kirjanduse ülevaates embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumist ning erinevaid diferentseerimise indutseerimise võimalusi. Kirjanduse ülevaate lõpuks anti ülevaade arüüsüsivesinike retseptorist ja selle teadaolevatest regulatoorsetest funktsioonidest organismides.

Käesoleva bakalaureusetöö praktilise osa tulemusena selgus kvantitatiivse PCR-i meetodil, et embrüonaalsete tüvirakkude spontaansel diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks langeb arüüsüsivesinike retseptori ekspressioon. Ka valgu tasemel läbi viidud Western Blot analüüs näitas AHR-i ekspressiooni langust. Edasisel hES rakkude suunatud diferentseerimisel neuraalsesse suunda selgus kvantitatiivse PCR-i meetodil, et *AHR*-i ekspressioon langes ka neuraalse suuna rakkudes. Seda kinnitas ka Western Blot analüüs. Samuti viidi qPCR läbi ka mesodermaalsesse suunda diferentseeritud rakkudes ja definitiivse endodermi rakkudes, mis sarnaselt neuraalsele suunale näitasid arüüsüsivesinike retseptori ekspressiooni vähenemine diferentseerumisel. Western Blot analüüs kinnitas, et ka valgu tasemel toimub ekspressiooni vähenemine.

Kuna on näidatud, et retinoolhappega diferentseeritud rakkudes *AHR*-i ekspressioon suureneb, siis analüüsiti ka eelnevalt retinoolhappega töödeldud rakkude RNA-d, et näha, kas retinoolhappe puhul saab täheldada erinevat muutust. Kvantitatiivse PCR-i tulemused näitasid, et retinoolhappega diferentseerides *AHR*-i ekspressioon tõepoolest kasvab.

Käesolev bakalaureusetöö tõestab, et inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks, neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ja definitiivse endodermi rakkudeks arüüsüsivesinike retseptori ekspressioon langeb nii mRNA kui valgu tasemel.

The Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in the Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells

Keyt Uudeküll

SUMMARY

Human embryonic stem (hES) cells are derived from the inner cell mass of the blastocyst. They are pluripotent, which means they are able to differentiate into all of the derivatives of the three primary germ layers. Transcription factors are required for the maintenance of pluripotency, of which OCT4, SOX2 and Nanog are the most important and therefore used as genetic markers to identify human embryonic stem cells.

hES cells have the ability to differentiate into all three germ layers. When grown in suspension culture hES cells differentiate into embryoid bodies, which are complex and three-dimensional cell aggregates. In addition, it is possible to induce their differentiation when cultured with specific inducing chemicals or special media. This provides the possibility to further study different developmental processes.

Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a transcription factor involved in the regulation of biological responses to different environmental chemicals. Nevertheless, it has been shown that it has several regulatory roles, being the regulator of cell cycle, cell proliferation and having importance in the development of the immune system.

Previous studies have shown that the expression of *Ahr* in mice increases with the differentiation of embryonic stem cells. Therefore, the purpose of this bachelor's thesis was to investigate whether the expression of aryl hydrocarbon receptor shows similar trend in the early differentiation of hES cells.

To achieve the purpose, hES cells were cultured in suspension culture to differentiate them into embryoid bodies. In addition, they were cultured in specific induction medium in order to differentiate them into neural progenitors, early mesodermal and definitive endoderm cells. The expression of aryl hydrocarbon receptor was analysed by quantitative PCR and Western Blot analysis. The results of current bachelor's thesis showed that both the levels of mRNA and protein showed a significant decrease when hES cells were differentiated into embryoid bodies, neural progenitors, early mesoderm and definitive endoderm cells. In addition, qPCR and Western Blot analysis were conducted in order to observe OCT4 levels. Results showed that

both the levels of mRNA and protein decreased in differentiated cells, proving that hES cells had undergone differentiation. As previous studies have also shown that the treatment of hES H1 cell line with retinoic acid induces the expression of *AHR* in correlation with the differentiation of these cells, the expression of *AHR* was also analysed in H9 cells treated with retinoic acid. The results of these analyses showed a similar upward trend in *AHR* expression after treatment with retinoic acid.

The outcomes of the current bachelor's thesis indicate that the expression of aryl hydrocarbon receptor decreases with the differentiation of hES cells into embryoid bodies, neural progenitors, early mesodermal and definitive endoderm cells. Nevertheless, after the treatment of hES cells with retinoic acid *AHR* expression shows an upward trend, suggesting that retinoic acid induces hES cells to develop into a differentiation stage prior to what we investigated during differentiation induced by commercially available media in the current bachelor's thesis.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Indrek Teinot, kes abistas katsete läbiviimisel ja analüüsimisel ning käesoleva bakalaureusetöö koostamisel. Samuti sooviksin tänada Martin Pooki ja Antti Matvere, kes andsid vajalikku nõu ja vastasid tekkinud küsimustele. Sealhulgas sooviksin tänada ka Annika Treid, kes tagas selle, et tüvirakke, mille peal katseid teha, oleks alati saada.

KIRJANDUSE LOETELU

1. Abbott, B.D., Schmid, J.E., Pitt, J.A., Buckalew, A.R., Wood, C.R., Held, G.A. (1999). Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 155: 62-70.
2. Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller III, C.A., Kato, T., Saeki, K., Matsuda, T. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. 276: 31475- 31478.
3. Antonsson, C., Arulampalam, V., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Poellinger, L. (1995). Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via the E box motif. *J Biol Chem.* 270: 13968-72.
4. Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function. *Genes Dev.* 17: 126-140
5. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties *in Vitro*. *Dev Biol.* 168: 342-357.
6. Benedict, J.C., Lin, T.M., Loeffler, I.K., Peterson, R.E., Flaws, J.A. (2000). Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol Sci.* 56: 382-388.
7. Bernardo, A.S., Faial, T., Gardner, L., Niakan, K.K., Ortmann, D., Senner, C.E., Callery, E.M., Trotter, M.W., Hemberger, M., Smith, J.C., Bardwell, L., Moffett, A., Pedersen, R.A. (2011). Brachyury and cdx2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. 9: 144-155.
8. Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.W., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A. (2005). Core Transcriptional Regulatory in Human Embryonic Stem Cells. *Cell.* 122: 947-956.
9. Callero, M.A., Loaiza-Pérez, A.I. (2011). The role of aryl hydrocarbon receptor and crosstalk with estrogen receptor in response of breast cancer cells to the novel antitumor agents benzothiazoles and aminoflavone. *Int J Breast Cancer.* 2011: 1-9.
10. Cauchi, S., Stucker, I., Cenee, S., Kremers, P., Beaune, P., Massaad-Massade, L. (2003). Structure and polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) gene in French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer. *Pharmacogenetics.* 13: 339-347.
11. Cerdan, C., Rouleau, A., Bhatia, M. (2004). VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood.* 103: 2504-2512.

12. Chang, H., Su, J.M., Huang, C.C., Liu, L.C., Tsai, C.H., Lin, P. (2005). Using a combination of cytochrome P450 1B1 and beta-catenin for early diagnosis and prevention of colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 29: 562-569.
13. Chang, J.T., Chang, H., Chen, P.H., Lin, S.L., Lin, P. (2007). Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for CYP1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 13: 38-45.
14. Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell.* 10: 615-624.
15. Cheng, A.M., Saxton, T.M., Sakai, R., Kulkarni, S., Mbamalu, G., Vogel, W., Tortorice, C.G., Cardiff, R.D., Cross, J.C., Muller, W.J., Pawson, T. (1998). Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell.* 95: 793-803.
16. Cheng, J., Wenxin, L., Kang, B., Yanwen, Z., Song, J., Dan, S., Yang, Y., Zhang, X., Li, J., Yin, S., Cao, H., Yao, H., Zhu, C., Yi, W., Zhao, Q., Xu, X., Zheng, M., Zheng, S., Li, L., Shen, B., Wang, Y.J. (2015). Tryptophan derivatives regulate the transcription of Oct4 in stem-like cancer cells. *Nature Communications.* 6: 1-13.
17. Cho, S.K., Webber, T.D., Carlyle, J.R., Nakano, T., Lewis, S.M., Zuniga-Pflucker, J.C. (1999). Functional characterization of B lymphocytes generated in vitro from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 9797-9802.
18. Colman, A. (2004). Making new β cells from stem cells. *Semin Cell Dev Biol.* 15: 337-345.
19. D'amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E., Baetge, E.E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnol.* 23: 1534-1541.
20. Dang, S.M., Kyba, M., Perlingeiro, R., Daley, G.Q., Zandstra P.W. (2002). Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng.* 78: 442-453.
21. Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P., Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions.* 141: 3-24.
22. Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science.* 268: 722-726.
23. Fong, H., Hohenstein, K.A., Donovan, P.J. (2008). Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 26: 1931-1938.

24. Gasiewicz, T.A., Singh, K.P., Bennett, J.A. (2014). The Ah receptor in stem cell cycling, regulation and quiescence. *Ann N Y Acad Sci.* 1310: 44-50.
25. Gilbert, S.F. 2010. Early development in vertebrates. Early mammalian development. Introducing organogenesis. lk. 300-483. 10th ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
26. Gillner, M., Bergman, J., Cambillau, C., Alexandersson, M., Fernstro, B., Gustafsson, J.A. (1993). Interactions of indolo[3,2-*b*]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat liver. *Mol Pharmacol.* 44: 336-345.
27. Heath-Pagliuso, S., Rogers, W.J., Tullis, K., Seidel, S.D., Ceniijn, P.H., Brouwer, A., Denison, M.S. (1998). Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry.* 37: 11508-11515.
28. Hermann, H. (2013). Arüülsüivesinike retseptori roll inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusmarkerite ekspressioonis ning rakutsükli regulatsioonis. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
29. Hockings, J.K., Thorne, P.A., Kemp, M.Q., Morgan, S.S., Selmin, O., Romagnolo, D.F. (2006). The ligand status of the aromatic hydrocarbon receptor modulates transcriptional activation of BRCA-1 promoter by estrogen. *Cancer Res.* 66: 2224-2232.
30. Hu, W., Zhao, J., Pei, G. (2013). Activation of aryl hydrocarbon receptor (ahr) by tranilast, an anti-allergy drug, promotes miR-302 expression and cell reprogramming. *J Biol Chem.* 288: 22972-22984.
31. Huang, T.C., Chang, H.Y., Chen, C.Y., Wu, P.Y., Lee, H., Liao, Y.F., Hsu, W.M., Huang, H.C., Juan, H.F. (2011). Silencing of miR-124 induces neuroblastoma SK-N-SH cell differentiation, cell cycle arrest and apoptosis through promoting AHR. *FEBS Letters.* 585: 3582-3586.
32. Hushka, D.R., Greenlee, W.F. (1995). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits DNA synthesis in rat primary hepatocytes. *Mutat Res.* 333: 89-99.
33. Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., Kawajiri, K. (1998). Nuclear Localization and Export Signals of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *J Biol Chem.* 273: 2895-2904.
34. Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med.* 6: 88-95.
35. Kafafi, S.A., Afeefy, H.Y., Said, H.K., Kafafi, A.G. (1993). Relationship between aryl hydrocarbon receptor binding, induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and 7-

- ethoxyresorufin *o*-deethylase enzymes and toxic activities of aromatic xenobiotics in animals. A new model. *Chem Res Toxicol*. 6:328-334.
36. Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J.M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P.P., Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*. 129: 2367-2379.
 37. Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*. 274: 13519-13524.
 38. Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., Thomson, J.A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 98:10716-10721
 39. Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Dev*. 19: 1129-1155.
 40. Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., Wiles, M. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*. 13: 473-486.
 41. Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 418: 50-56.
 42. Ko, C.I., Wang, Q., Fan, Y., Xia, Y., Puga, A. (2014). Pluripotency factors and Polycomb Group proteins repress aryl hydrocarbon receptor expression in murine embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 12: 296-308.
 43. Kumar, M.B., Ramadoss, P., Reen, R.K., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (2001). The Q-rich Subdomain of the Human Ah Receptor Transactivation Domain Is Required for Dioxin-mediated Transcriptional Activity. *J Biol Chem*. 276: 42302-42310.
 44. Lee, J., Yeom, G., Kang, I., Han, Y.M., Kim, J. (2010). Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. *Biochem J*. 426: 171-181.
 45. Li, D., Liu, C., Yu, H., Zeng, X., Xing, X., Chen, L., Gao, C., Zhang, Z., Xiao, Y., Duan, H., Zheng, Y., Wang, Q., Chen, W. (2013). AHR is negatively regulated by miR-203 in response to TCDD or BaP treatment. *Toxicol Res*. 3: 142- 151.
 46. Lodish, H., Berk, A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M., Kaiser, C.A. 2012. *Molecular Cell Biology*. Stem Cells. lk. 978-994. 7th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

47. Ma, Q., Baldwin, K.T. (2000). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J Biol Chem.* 275: 8432-8438.
48. Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 78: 7634-7638.
49. Matsushita, N., Sogawa, K., Ema, M., Yoshida, A., Fujii-Kuriyama, Y. (1993). A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt. *J Biol Chem.* 268: 21002-21006.
50. Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol.* 18: 987-988.
51. Miller III, C.A. (1997). Expression of the human aryl hydrocarbon complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J Biol Chem.* 272: 32 824-32 829.
52. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 113: 631-642.
53. Morris, R.J., Tryson, K.A., Wu, K.Q. (2000). Evidence that the epidermal targets of carcinogen action are found in the interfollicular epidermis of infundibulum as well as in the hair follicles. *Cancer Res.* 60: 226-229.
54. Nakano, T., Kodama, Honjo,T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science.* 265: 1098-1101.
55. Niakan, K.K., Ji, H., Maehr, R., Vokes, S.A., Rodolfa, K.T., Sherwood, R.I., Yamaki, M., Dimos, J.T., Chen, A.E., Melton, D.A., McMahon, A.P., Eggan, K. (2010). Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *24: 312-326.*
56. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis K., Niwa, H., Klew-Nebenius, D., Chamber, I., Schöler, H., Smith, A. (1998). Formation of Pluripotent Stem cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 95: 379-391.
57. Niwa, H., Miyazaki, J.I., Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genet.* 24: 372-376.
58. Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M., McKay, R.D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* 59: 89-102.

59. Papoutsis, A.J., Lamore, S.D., Wondrak, G.T., Selmin, O.I., Romagnolo, D.F. (2010). Resveratrol prevents epigenetic silencing of BRCA-1 by the aromatic hydrocarbon receptor in human breast cancer cells. *J Nutr.* 140:1607-1614.
60. Phelan, D., Winter, G.M., Rogers, W.J., Lam, J.C., Denison, M.S. (1998). Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. 357: 155-163.
61. Poland, A., Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 22: 517-542.
62. Pollenz, R.S., Sattler, C.A., Poland, A. (1994). The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol.* 45: 428-438.
63. Pook, M. (2015). Studies on artificial and extracellular matrix protein-rich surfaces as regulators of cell growth and differentiation. Doktoritöö. Tartu Ülikool.
64. Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S., Agbunag, R.V., Ong, M.S., Hankinson, O. (1993). Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol Pharmacol.* 44: 511-518.
65. Prowse, A.B.; McQuade, L.R., Bryant, K.J.; Marcal, H.; Gray, P.P. (2007). Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *J. Proteome Res.* 6: 3796-3807.
66. Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.I. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 77:713-722.
67. Ramirez, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Milhavet, O., Qiang, B., Becker, F., Assou, S., Lemaître, J.M., Hamamah, S., De Vos, J. (2011). Brief report: Benchmarking human pluripotent stem cells markers during differentiation into the three germ layers unveils a striking heterogeneity: all markers are not equal. *Stem Cells.* 29: 1469-147.
68. Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnol.* 18: 399-404.
69. Rodda, D.J., Chez, J.L., Lim, L.H., Loh, Y.H., Wang, B., Ng, H.H., Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of Biological Chemistry.* 280: 24731-24737.
70. Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic

considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). Crit Rev Toxicol. 21: 51-88.

71. Seidel, S.D., Winters, G.M., Rogers, W.J., Ziccardi, M.H., Li, V., Keser, B., Denison, M.S. (2001). Activation of the Ah receptor Signaling Pathway by Prostaglandins. 15: 187-196.

72. Seifert, A., Taubert, H., Hombach-Klonisch, S., Fischer, B., Navarrete-Santos, A. (2009). TCDD mediates inhibition of p53 and activation of ER alpha signaling in MCF-7 cells at moderate hypoxic conditions. Int J Oncol. 35: 417-424.

73. Stoffel, M., Vallier, L., Pedersen, R.A. (2004). Navigating the pathway from embryonic stem cells to β cells. Semin Cell Dev Biol. 15: 327-336.

74. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cells derived from human blastocysts. Science. 282: 1145-1147.

75. Thurmond, T.S., Staples, J.E., Silverstone, A.E., Gasiewicz, T.A. (2000). The aryl hydrocarbon receptor has a role in the in vivo maturation of murine bone marrow B lymphocytes and their response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol Appl Pharmacol. 165: 227-236.

76. Tian, E., Kimura, C., Takeda, N., Aizawa, S., Matsuo, I. (2002). Otx2 is required to respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification. Dev Biol. 242: 204-223.

77. Waller, C.L., McKinney, J.D. (1992). Comparative molecular field analysis of polyhalogenated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and biphenyls. J Med Chem. 35: 3660-3666.

78. Waller, C.L., McKinney, J.D. (1995). Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization. Chem Res Toxicol. 8: 847-858.

79. Wells, J.M., Melton, D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. Annu Rev Cell Dev Biol. 15: 393-410.

80. Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nature Biotechnol. 19: 971-974.

KASUTATUD VEEBIALLIKAD

1. NCBI a. Kasutatud 13.01.2016 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5460>
2. NCBI b. Kasutatud 13.01.2016 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657>
3. NCBI c. Kasutatud 14.01.2016 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79923>

4. Ensembl. Kasutatud 03.04.2016

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000106546;r=7:17298622-17346152

5. NCBI d. Kasutatud 14.04.2016 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/196>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Keyt Uudeküll

(sünnikuupäev: 04.04.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

"Arüülsüsivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude varasel diferentseerumisel",

mille juhendaja on Indrek Teino,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **03.06.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016